

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN III
PROF. DR. MED. WOLFGANG HERR
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Immunophänotypisierung FOXP3-instabiler regulatorischer T-Zellen mittels
Durchflusszytometrie und Gesamt-Genom-Microarrays

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Janina Paula Höfer

2017

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN III
PROF. DR. MED. WOLFGANG HERR
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Immunophänotypisierung FOXP3-instabiler regulatorischer T-Zellen mittels
Durchflusszytometrie und Gesamt-Genom-Microarrays

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Janina Paula Höfer

2017

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Matthias Edinger
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Uwe Ritter
Tag der mündlichen Prüfung:	28. Juni 2017

meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung	1
1.1 T-Lymphozyten und die zelluläre Immunantwort	1
1.2 T-Helferzellsubpopulationen	4
1.3 Regulatorische T-Zellen	7
1.4 T-Zellplastizität.....	10
1.5 Bedeutung der regulatorischen T-Zellen für die klinische Medizin	12
2 Zielsetzung.....	17
3 Material und Methoden.....	18
3.1 Material.....	18
3.1.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien	18
3.1.2 Antikörper gegen humane Antigene	18
3.1.3 Chemikalien und Reagenzien	20
3.1.4 Enzyme, Stimulanzien und Kits	21
3.1.5 Geräte und Ausrüstung.....	21
3.1.6 Medien, Puffer und Lösungen.....	22
3.1.7 Software	23
3.2 Methoden.....	24
3.2.1 Isolation mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut	24
3.2.2 Ermittlung der Zellzahl	24
3.2.3 Magnetische Zellseparation	24
3.2.4 Isolierung, Kultivierung sowie phänotypische und funktionelle Charakterisierung regulatorischer T-Zellen.....	25
3.2.5 Zellfärbung mit Antikörpern für durchflusszytometrische Analysen	27
3.2.6 RNA-Extraktion.....	28
3.2.7 RNA-Quantifizierung mit Hilfe des Nanodrop-Spektrophotometers	29
3.2.8 Überprüfung der RNA-Qualität mittels Bioanalyzer oder RNA-Gelelektrophorese.....	29
3.2.9 Microarrays.....	30

3.2.10 Statistik.....	31
4 Ergebnisse	32
4.1 Validierung der Antikörper gegen die Transkriptionsfaktoren FOXP3, T-bet, GATA3 und ROR γ (t) für die FACS-Färbung in Zellen des peripheren Blutes	32
4.1.1 Transkriptionsfaktorexpression in unstimulierten PBMC	32
4.1.2 Transkriptionsfaktorexpression in stimulierten PBMC	36
4.1.3 Simultaner Nachweis intranukleärer Transkriptionsfaktoren und intrazytoplasmatischer Zytokine in T-Helferzellen	37
4.2 Etablierung einer intranukleären FACS-Färbung mit der Möglichkeit der anschließenden RNA-Extraktion	42
4.3 Immunophänotypisierung FOXP3-instabiler regulatorischer T-Zellen mittels Durchflusszytometrie und Gesamt-Genom-Microarrays.....	51
4.3.1 Transkriptomanalyse <i>in vitro</i> expandierter Treg mit heterogener FOXP3-Expression	51
4.3.2 Analyse <i>in vitro</i> expandierter Treg auf Proteinebene mittels FACS und Verifizierung ausgewählter Microarraydaten	53
5 Diskussion.....	59
5.1 FOXP3, T-bet, GATA3 und ROR γ (t) Antikörper für durchflusszytometrische Analysen.....	59
5.2 RNA aus intranukleär gefärbten und FACS-gesorteten Zellen	65
5.3 Differenzierung regulatorischer T-Zellen nach FOXP3-Verlust.....	67
5.4 Zusammenfassung	72
6 Anhang.....	74
6.1 Tabellenverzeichnis	74
6.2 Abbildungsverzeichnis	75
7 Literaturverzeichnis	77
8 Danksagung	85
9 Lebenslauf.....	86

Abkürzungsverzeichnis

AF	Alexa Fluor
APC	Antigen präsentierende Zelle
CCR7	<i>C-C chemokine receptor 7</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CLP	<i>common lymphoid progenitor</i> /lymphatische Vorläuferzelle
CTLA4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zelle
DEPC	Diethyldicarbonat
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FOXP3	<i>forkhead box protein 3</i>
GATA3	<i>trans-acting T-cell-specific transcription factor</i> GATA3
GFI1	<i>growth factor independence 1</i>
GITR	<i>glucocorticoid-induced TNF receptor-related gene</i>
GvHD	Spender-gegen-Wirt Erkrankung
GvL	Spender-gegen-Leukämie Reaktion
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRF4	<i>interferon regulatory factor 4</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
NKT-Zelle	Natürliche Killer-T-Zelle
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nTreg	„Natürliche“, thymusstämmige Treg
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PRR	<i>pattern recognition</i> Rezeptor
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat

RNA	Ribonukleinsäure
RNasen	Ribonukleasen
RORC	<i>RAR-Related orphan receptor C gene</i>
ROR γ (t)	<i>RAR-related orphan receptor γ(t)</i>
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SD	Standardabweichung
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SZT	Stammzelltransplantation
T-bet	<i>T-box transcription factor Tbx21</i>
Tbx21	T-box21 Gen
TCR	T-Zellrezeptor
T _{CM}	T <i>central memory</i> Zellen
T _E	T-Effektorzelle
T _{EM}	T-Effektor <i>memory</i> Zelle
TF	Transkriptionsfaktor
TfH	follikuläre T-Helferzelle
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Th	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	<i>tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>
Treg	Regulatorische T-Zelle

1 Einleitung

1.1 T-Lymphozyten und die zelluläre Immunantwort

Das Immunsystem dient zur Sicherung des Überlebens indem es den Körper von eingedrungenen Mikroorganismen und fremden Substanzen befreit, aber auch für die Zerstörung entarteter körpereigener Zellen sorgt. Im Laufe der Evolution entwickelte der menschliche Organismus hierfür ein äußerst effektives und komplexes Abwehrsystem, das sich in einen humoralen und einen zellulären Teil gliedern lässt. Eine Schlüsselrolle für die effektive Elimination von Pathogenen, die Ausbildung eines Immungedächtnisses und die Entwicklung von Toleranz spielen hierbei die Zellen des Immunsystems, welche aus den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks hervorgehen (Abbildung 1). Multipotente hämatopoetische Stammzellen sichern ihren Bestand durch Selbsterneuerung, ein Teil entwickelt sich jedoch weiter in Richtung der verschiedenen, zunehmend differenzierten Zelllinien, wodurch sie einzigartige zelltypspezifische Fähigkeiten erlangen und sukzessive ihre multipotenten Eigenschaften einbüßen.

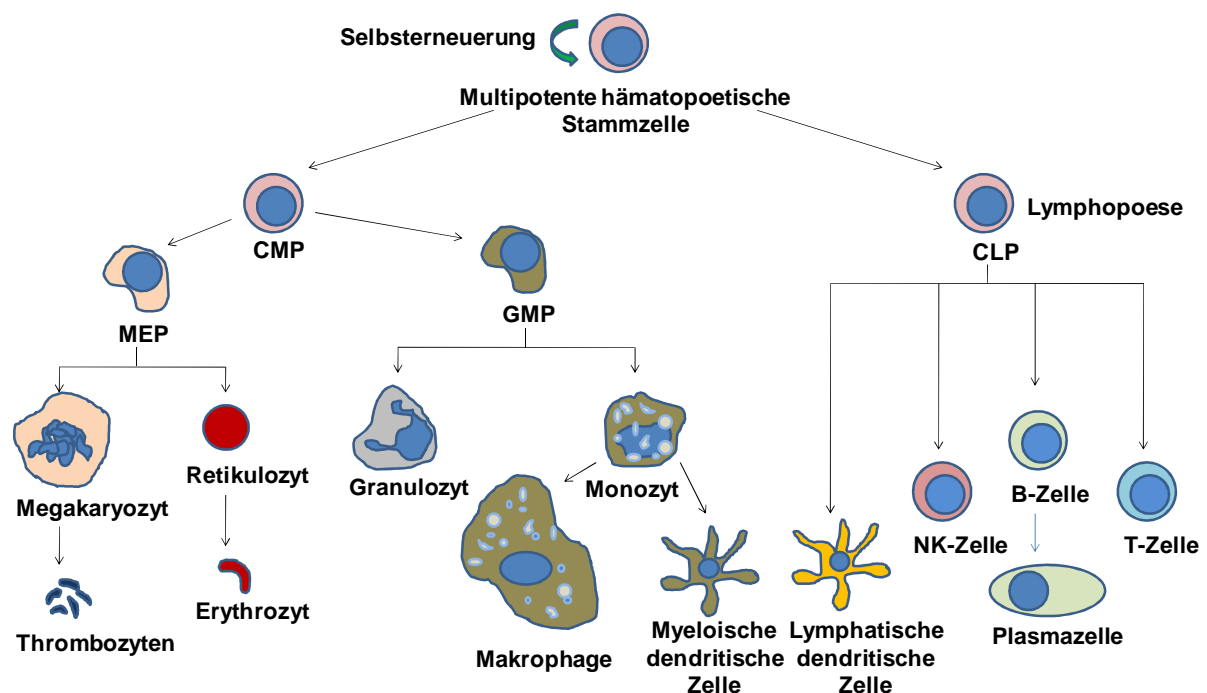


Abbildung 1: Humane Hämatopoese

Aus multipotenten Stammzellen im Knochenmark entstehen myeloische (common myeloid precursor, CMP) und lymphatische (common lymphoid precursor, CLP) Vorläuferzellen. Die Stammzellen erhalten ihre Anzahl durch Selbsterneuerung. Aus CLPs entwickeln sich T-Zellen, NK-Zellen, lymphatische dendritische Zellen und B-Zellen. Aus CMPs entwickeln sich über megakaryozytäre Vorläufer (megakaryotic/erythroid progenitor, MEP) sowohl die Megakaryozyten, welche die Thrombozyten ins Blut abgeben, als auch über mehrere Zwischenstufen die kernlosen Erythrozyten. Aus CMPs entwickeln sich über myelomonozytäre Vorläufer (granulo/myelomonocytic progenitor, GMP) Granulozyten sowie Monozyten. Letztere differenzieren im Gewebe zu myeloischen dendritischen Zellen (DCs) und Makrophagen. Modifiziert nach [1].

In dieser Arbeit gilt das Augenmerk den T-Lymphozyten, welche Bestandteil des zellulären Immunsystems sind. Sie gehen, neben NK-Zellen, lymphatischen dendritischen Zellen und B-Zellen, aus den lymphatischen Vorläuferzellen (CLP) hervor und sind auf drei Arten an der immunologischen Elimination von Fremdanthigenen beteiligt: Durch direkte Erkennung körperfremder Strukturen auf körpereigenen Zellen und Elimination der betroffenen Zellen (v.a. durch $CD8^+$ T-Zellen vermittelt); durch Interaktion mit B-Zellen, deren Stimulation mit nachfolgender Differenzierung sowie Antikörperproduktion (v.a. durch $CD4^+$ T-Helferzellen vermittelt) und durch Induktion von Toleranz und Verhinderung einer überschießenden Reaktion des Immunsystems (v.a. durch $CD4^+$ regulatorische T-Zellen vermittelt). T-Zellen besitzen alle einen membranständigen T-Zellrezeptor (TCR), über den sie spezifisch Antigene erkennen können. Die Spezifität dieses Antigenrezeptors entsteht während der Lymphozytenreifung durch somatische Rekombination von Rezeptorgensegmenten und ist daher von T-Zelle zu T-Zelle verschieden. Die jeweils passenden Antigene können von T-Zellen mittels ihres TCR jedoch nur erkannt werden, wenn sie von Zellen über bestimmte Moleküle präsentiert werden. Bei diesen Molekülen handelt es sich um die Gruppe der *major histocompatibility complex* (MHC)-Moleküle [2]. MHC-Moleküle sind für nahezu jedes Individuum einzigartig und stellen mit die polymorphsten Gene des Menschen dar (HLA im Humansystem). MHC-Moleküle der Klasse I werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert und präsentieren Peptide aus zelleigenen, zytoplasmatischen Proteinen. MHC Klasse II-Moleküle hingegen werden nur von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC), oder von nicht-professionellen APC (z.B. Epithel- und Endothelzellen, Fibroblasten) nach Stimulation exprimiert und präsentieren nach Internalisierung und Prozessierung in erster Linie Peptide aus extrazellulären Proteinen [3].

Erkennt eine naive, also antigenunerfahrene T-Zelle ein zu ihr passendes Antigen mittels ihres TCR kann es zur Aktivierung dieser kommen. Das entsprechende Antigen wird den naiven T-Zellen dabei von aktivierten APC in den T-Zellzonen der sekundär lymphatischen Organe dargeboten. Eine effektive Aktivierung der T-Zellen erfolgt jedoch erst nach zusätzlicher Übermittlung kostimulatorischer Signale durch die APC. Bleiben die kostimulatorischen Signale (kostimulatorische Auxillärproteine) aus, kommt es zur unvollständigen T-Zellaktivierung oder zum Stadium der Anergie [4]. Die Kostimulation erfolgt hierbei unter anderem über Moleküle der B7-Familie (u.a. CD80 und CD86), welche kompetente APC nach Stimulierung über sogenannte *pattern recognition* Rezeptoren (PRR) hochregulieren. PRR sind Proteine, mithilfe derer die Zellen des angeborenen Immunsystems mikrobielle Erreger erkennen können [5]. Die Struktur der PRRs wird im Laufe des Lebens nach derzeitigem Verständnis nicht angepasst und ihre Spezifität beschränkt sich auf meist hochkonservierte molekulare Muster (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs), wie etwa die bakteriellen Zellwandbestandteile

Lipopolysaccharid, Mannose und Peptidoglykan sowie Nukleinsäuren von Bakterien und Viren [6].

Auf der Seite der T-Zellen tragen unter anderem die Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 zu einer Stabilisierung der Interaktion bei, die letztendlich zur Ausbildung einer immunologischen Synapse führt [7]. Diese Oberflächenmoleküle werden auch zur Unterscheidung der zwei großen Subgruppen unter den T-Zellen herangezogen. CD8⁺ zytotoxische T-Zellen erkennen Peptid/MHCI Komplexe und beseitigen nach der Erkennung entartete oder infizierte Zellen z.B. durch Induktion von Apoptose [8]. CD4⁺ T-Lymphozyten erkennen auf MHCII präsentierte Peptide und werden auch als T-Helferzellen bezeichnet. Sie stellen 30-60% der Lymphozyten eines Erwachsenen dar und beeinflussen nach Aktivierung durch die Rekrutierung anderer Immunzellen und die Produktion bestimmter Zytokine entscheidend die Immunantwort. Die Tatsache, dass sowohl CD4⁺, als auch CD8⁺ T-Zellen ihre jeweiligen Antigene nur in Form von MHC/Peptidkomplexen erkennen können, bezeichnet man als „MHC-restringierte“ Antigenerkennung [9, 10].

Die Vorläuferzellen des T-Zellkompartimentes (Thymozyten) gelangen aus dem Knochenmark über die Blutbahn zum Thymus, in dem ihre weitere Reifung und Differenzierung erfolgt [11]. Die verschiedenen Phasen sind jeweils durch unterschiedliche Zustände der T-Zellrezeptorgene und eine charakteristische Kombination von Oberflächenrezeptoren (CD3, CD4, CD8) auf den Thymozyten gekennzeichnet. Im Knochenmark exprimieren die Vorläuferzellen der T-Zellen keine der Oberflächenmoleküle, welche reife T-Zellen auszeichnen (doppelt negative Thymozten). Erst im Thymus beginnt die Expression von sowohl CD4 als auch CD8 auf allen Thymozyten (doppelt positive Thymozyten). Des Weiteren kommt es zur Expression von CD3 und einem Prä-T-Zellrezeptor. Aus dem Prä-T-Zellrezeptor entwickelt sich später der für jede T-Zelle einzigartige TCR, über den sich auch die jeweilige Antigenpezifität der T-Zelle definiert. Um die Erkennung körpereigener Antigene durch die neu entstehenden T-Zellrezeptoren auszuschließen findet im Thymus die „Positiv- und Negativselektion“ statt. Reife T-Zellen müssen Pathogene oder körperfremde Strukturen äußerst gezielt und effektiv neutralisieren können oder antikörpervermittelte Immunität unterstützen. In ihrer Funktion als „Polizei des Körpers“ müssen sie zudem in der Lage sein, sicher zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen zu unterscheiden. Im Kortex des Thymus durchlaufen die Thymozyten die „Positivselektion“. Hierbei müssen sie von kortikalen Thymusepithelzellen präsentierte MHC/Peptidkomplexe mit einer bestimmten Affinität erkennen, um dem sogenannten „*death by neglect*“ zu entgehen. Die überlebenden Thymozyten wandern anschließend in die Medulla, wo sie von Thymusepithelzellen der Medulla und anderen APC erneut MHC/Peptidkomplexe präsentiert bekommen. Zeigt der TCR hierfür eine zu hohe Affinität, besteht die Gefahr einer späteren Autoreaktivität der entsprechenden T-Zelle und

sie wird durch Apoptoseinduktion eliminiert [12]. Nach ihrer Differenzierung werden die gereiften, noch naiven T-Zellen ins Blut- und Lymphsystem entlassen und patrouillieren diese.

1.2 T-Helferzellsubpopulationen

Im peripheren Blut finden sich $CD4^+$ antigenunerfahrene „naive“ und antigenerfahrene „Gedächtnis“ (oder „*memory*“) T-Zellen. Bei Auftreten eines antigenen Reizes (z.B. einer Infektion) kommt es zu einer Aktivierung und nachfolgend zu einer starken Expansion antigenspezifischer T-Zellen. Im Keimzentrum sekundärer lymphatischer Organe (durch B-Zellen gebildet) differenzieren zudem auch einige der aktivierten, proliferierenden $CD4^+$ T-Zellen zu Gedächtniszellen. Nach erfolgter Eliminierung des entsprechenden Auslösers/Pathogens setzt eine sogenannte Kontraktionsphase ein, bei der fast alle spezifischen T-Zellen über Apoptoseinduktion eliminiert werden. Zurück bleiben lediglich einige wenige Gedächtniszellen, die bei einem erneuten Kontakt mit demselben Pathogen für eine schnellere und effektivere Immunantwort sorgen. Naive und *memory* T-Zellen können u.a. anhand der unterschiedlichen Expression der Proteintyrosinphosphatasen CD45RA und CD45RO identifiziert werden. Das CD45 Antigen gehört zur Gruppe der Proteintyrosinphosphatasen, welche Signalmoleküle in der Regulation einer Reihe von wichtigen zellulären Prozessen darstellen. Das Transmembranprotein ist in verschiedenen Isoformen auf fast allen differenzierten hämatopoetischen Zellen zu finden. Alle acht unterschiedlichen Isoformen entstehen aus einem Gen, welches 34 Exons besitzt. Durch alternatives Spleißen entstehen die unterschiedlichen Varianten, unter anderem CD45RA und CD45RO. Das längste Transkript, CD45RA, findet sich auf naiven T-Zellen, während CD45RO auf aktivierten T-Zellen und T-Gedächtniszellen zu finden ist. CD45RO ist das kürzeste Transkript und unterstützt die TCR-vermittelte Aktivierung [13-17].

T-Helferzellen können in verschiedene „Linien“ eingeteilt werden, welche u.a. durch spezifische Zytokinexpressionsmuster definiert werden (Abbildung 2). In Richtung welcher dieser Subtypen sich naive T-Helferzellen entwickeln, ist dabei stark abhängig vom Zytokinemilieu in dem die T-Zellaktivierung stattfindet.

Die Erstbeschreiber zweier unterschiedlicher Gruppen von T-Helferzellen, Th1 und Th2 Zellen, waren 1989 Mosmann und Coffman. Th1 und Th2 Zellen unterscheiden sich nicht nur in ihrem Zytokinexpressionsmuster, sondern auch in den damit einhergehenden Funktionen [18]. Zunächst wurden die beiden Phänotypen in murinen T-Zellklonen beschrieben [19, 20], ihre Existenz jedoch später auch im humanen T-Zellkompartiment nachgewiesen [21, 22].

Th1 Zellen definieren sich durch die Expression von $IFN\gamma$, IL-2 sowie Lymphotoxin- α und vermitteln die Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene [18]. Das Th1 Differenzierungsprogramm wird v.a. durch IL-12 induziert, das nach Bindung an seinen Rezeptor die *signal*

transducer and activator of transcription 4 (STAT4)-vermittelte Signalkaskade initiiert, an deren Ende die Induktion des linienspezifischen Transkriptionsfaktors *T-box expressed in T cells* (T-bet) steht. T-bet wurde erstmals 2000 als 530 Aminosäuren langer, linienspezifischer TF für Th1 Zellen in der Maus beschrieben, konnte jedoch auch im Menschen mit hoher Deckungsgleichheit nachgewiesen werden. Im Protein findet sich eine charakteristische DNA-Bindungsstelle, die *T-box*. Alle Mitglieder der T-box Familie der TF definieren sich durch eben diese 200 Aminosäuren lange, homologe DNA Bindungsstelle; ihren Mitgliedern werden entscheidende Rollen in Entwicklungsprozessen zugeschrieben [23, 24]. Die linienspezifischen TF der Th1 und Th2 Zellen unterstützen jeweils den eigenen Differenzierungsweg und hemmen den des anderen [25]. So erhält T-bet nicht nur die IFN γ Produktion, sondern inhibiert auch die IL-4 sowie IL-5 Expression und somit die Th2 Differenzierung [26, 27]. Durch Bindung von T-bet an den Promotor des IRF4-Gens wird die IRF4-Expression vermindert und somit auch die Th17 Differenzierung [28]. Die Regulation der Mechanismen, welche zu einer bestimmten Differenzierung der Zellen führt, findet dabei nicht ausschließlich durch die hier genannten TF („Masterregulatoren“) statt, sondern stellt ein hoch komplexes Ineinandergreifen von Prozessen dar, an denen viele weitere TF aber auch nichtkodierende RNAs beteiligt sind [29]. Die hier genannten Masterregulatoren sind jedoch entscheidend und unerlässlich für die entsprechende T-Helferzellsubpopulation.

Th2 Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 und IL-25 [18]. Ihre Aufgabe ist die Abwehr von extrazellulären Pathogenen, sie haben jedoch auch durch die Induktion der Immunglobulin E-Produktion in B-Zellen einen nicht unwesentlichen Anteil an der Entstehung und Unterhaltung allergischer Reaktionen [30]. Der Signalweg zur Differenzierung führt im IL-4-reichen Milieu durch die Stimulation von IL-4R und folgender STAT6-Aktivierung zur Expression des linienspezifischen TF GATA-bindendes Protein 3 (GATA3) [31-33]. GATA3 blockiert das Th1 Programm und ist für die Th2 Zelldifferenzierung unerlässlich [34]. Alle Transkriptionsfaktoren der GATA-Familie enthalten zwei Zinkfinger motive, die vermutlich durch Genduplikationen entstanden sind. Man unterscheidet die hämatopoetischen TF (GATA1-3) von den endodermalen TF (GATA4-6); GATA3 findet sich sowohl in reifen, als auch in sich entwickelnden T-Zellen [35]. Neben seiner Aufgabe in der T-Zelldifferenzierung spielt GATA3 aber auch in der endothelialen Zellbiologie und der Differenzierung von Epithelien der weiblichen Brust eine wichtige Rolle [36] und wird in vielen weiteren Geweben exprimiert [37-39].

Mehrere Arbeitsgruppen beschrieben 2005 im Zusammenhang mit chronisch inflammatorischen Krankheiten und Autoimmunität das Vorkommen von Th17 Zellen [40-42]. Diese produzieren IL-6, IL-17A und IL-17F. Neben einer Schlüsselrolle in verschiedensten Autoimmunerkrankungen, wie z.B. der Psoriasis [43], zeigt sich deren Aufgabe v.a. bei der Abwehr extrazellulärer Bakterien und Pilze [44]. TGF β und IL-6 induzieren in naiven T-Zellen

die Produktion von IL-17 [45]. Die alleinige Stimulation mit TGF β fördert die Entstehung regulatorischer T-Zellen (Treg), während die zusätzliche Stimulation durch die proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-21 sowie IL-23 nicht nur zur Produktion von hohen Mengen an IL-17 führt, sondern auch die *forkhead box protein* (FOXP)3-abhängige Entwicklung von Treg blockiert. Im proinflammatorischen Milieu kommt es so zur Phosphorylierung von STAT3 und dies führt wiederum zur Expression des *retinoid-related orphan receptor* ROR γ (t) [46]. Das dem Transkript zugrunde liegende RORC Gen ist dabei essentiell für die Th17 Zelldifferenzierung und spielt in der Regulation der Expression von *interferon regulatory factor* (IRF)4 und IRF4 bindendem Protein eine Rolle. IRF4 wiederum steigert die IL17-Genexpression durch die Bindung an dessen Promoter [47, 48]. ROR γ (t) und ROR γ stellen zwei unterschiedliche Isoformen des RORC Transkripts dar [49]. Die Isoformen unterscheiden sich im N-terminalen Ende durch 13 Aminosäuren. ROR γ wird in vielen Geweben exprimiert, ROR γ (t) hingegen nur in bestimmten Lymphozyten, v.a. in doppelt positiven Thymozyten und in Th17 Zellen. Die Funktionen von ROR γ (t) können durch FOXP3 antagonisiert werden [50].

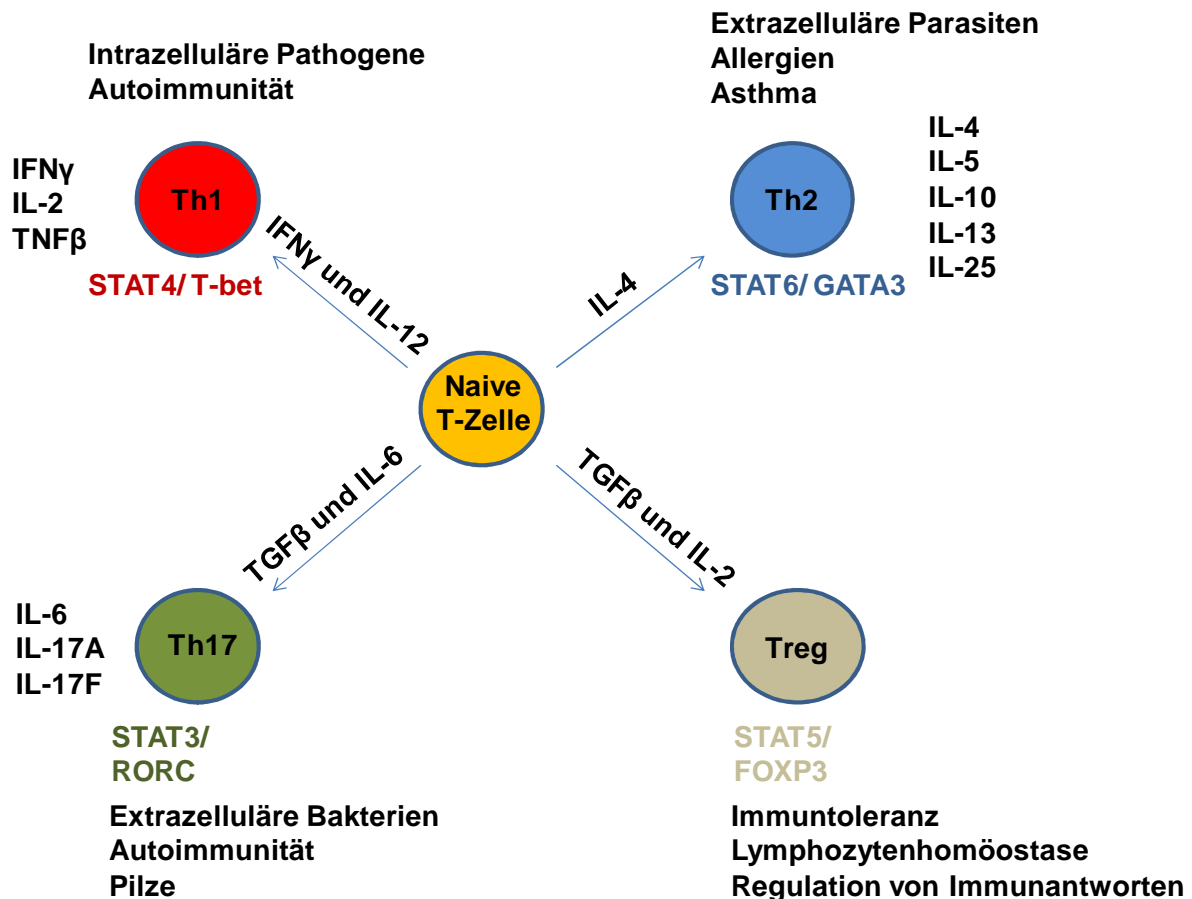


Abbildung 2: Differenzierungswege und Charakteristika verschiedener CD4⁺ T-Zellsubpopulationen

Dargestellt sind an der T-Helferzelldifferenzierung beteiligte Zytokine, Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle. Zudem sind wichtige Schlüsselfunktionen der einzelnen Populationen und damit einhergehende sezernierte liniendefinierende Zytokine vermerkt. Modifiziert nach [18].

1.3 Regulatorische T-Zellen

Th1, Th2 und Th17 Zellen sind verschiedene Subpopulationen von T-Helferzellen. Sie stellen den Großteil der CD4⁺ T-Zellen dar und erfüllen Abwehrfunktionen, gerichtet gegen zahlreiche Antigene bzw. Pathogene. 1995 beschrieb Sakaguchi erstmals die regulatorischen T-Zellen (Treg). Sie sind insofern einzigartig im T-Zellkompartiment, als dass sie die Möglichkeit besitzen, Immunantworten zu unterdrücken. Sie verhindern schädliche Überreaktionen und tragen zur peripheren Toleranz bei indem sie autoaggressive T-Zellen, welche während der thymischen Selektion nicht entfernt wurden, im peripheren Kompartiment bremsen.

Die essentielle Rolle von Treg für die periphere Toleranz zeigt sich darüber hinaus beim Fehlen von FOXP3, dem liniendefinierenden Transkriptionsfaktor für Treg, aufgrund genetischer Defekte beim Menschen oder nach *knock out* im Tiermodell. Beim Menschen kommt es durch Funktionsverlustmutationen in FOXP3 zum Immundysregulations, Enteropathie, Polyendokrinopathie, X-linked Syndrom (IPEX) [51]. Die Erkrankung ist auf-

grund der Lokalisation des FOXP3 Gens auf dem X-Chromosom bei Männern stärker ausgeprägt als bei Frauen und verläuft oft letal. Die einzige langfristig erfolgsversprechende Therapie ist die allogene Knochenmark-/Stammzelltransplantation. In murinen Versuchen zeigte sich durch Mutationen im Foxp3 Gen ein ähnliches klinisches Bild [52, 53]. Man geht davon aus, dass sowohl im Menschen als auch in der Maus mindestens zwei verschiedene Arten von Treg existieren: Neben den im Thymus entstandenen „natürlichen“ Treg (nTreg) gibt es auch Hinweise auf die Existenz von in der Peripherie induzierten Treg (iTreg) [54]. Der TCR von Treg weist eine hohe Affinität für Autoantigene auf; die Differenzierung zur nTreg im Thymus kann erfolgen, wenn bei der negativen Selektion im Thymus eine hohe Affinität des TCR zum angebotenen Autoantigen besteht [55-57]. Die genauen Abläufe während der Differenzierung der nTreg sind dabei noch nicht vollständig geklärt. Man weiß jedoch, dass die Entstehung von nTreg von einer konstant hohen und kontinuierlichen Expression des liniendefinierenden Transkriptionsfaktors FOXP3/Scurfin abhängt. Das X-chromosomale FOXP3 Gen gehört zur Familie der Forkhead-Gene und spielt neben seiner Rolle bei Autoimmunerkrankungen auch beim Mammakarzinom eine entscheidende Rolle. Hier stellt es sowohl in der Maus als auch beim Menschen ein wichtiges Tumorsuppressorgen dar [58]. FOXP3 gilt bisher als zuverlässigster linienspezifischer Marker der regulatorischen T-Zellen, da er fast ausschließlich in CD4⁺CD25⁺ Treg exprimiert wird und (zusammen mit vielen anderen Genen, dem Treg-assoziierten Transkriptom) für deren suppressive Eigenschaften unerlässlich ist [59-61]. Neben FOXP3 zeichnen sich Treg durch die Expression von CD25 aus. CD25 ist die membrangebundene α -Kette des IL-2-Rezeptor. IL-2 stellt einen essentiellen Wachstumsfaktor für nTreg in der Peripherie dar (wie für andere T-Zellen auch), kann jedoch nicht selbst von diesen gebildet werden [62, 63]. Durch die Verwendung des Markers CD127 wird eine Unterscheidung von letztlich aktivierten CD127⁺CD4⁺CD25⁺ T-Helferzellen und CD127^{low/-}CD4⁺CD25⁺ nTreg unter den CD4⁺CD25⁺ Zellen möglich [64, 65]. CD127 ist die α -Kette des IL-7-Rezeptors und wird auf Treg wenig bis gar nicht exprimiert. Treg exprimieren aber nicht nur CD25 sondern auch konstitutiv CTLA-4 [66] und GITR [67]. Die Expression der letzten beiden Marker ist jedoch für die regulatorische Funktion der Treg nicht obligat und deren Expression wird auch in anderen T-Helferzellpopulationen beobachtet. CTLA-4 ist an einer der mannigfaltigen Suppressionsmechanismen der Treg beteiligt. Es stellt den direkten Gegenspieler des kostimulatorischen CD28 dar, da er mit diesem um die Bindung an CD80 auf APC konkurriert.

Ein weiterer suppressiver Mechanismus der Treg ist u.a. die IL-2-Deprivation, bei der Treg das von den T-Helferzellen produzierte IL-2 „verbrauchen“ und so „knapp“ für diese machen [68] sowie die Sezernierung immunsuppressiv wirkender Zytokine wie z.B. IL-10, TGF β und

IL-35 [69]. TGF β induziert zudem die Expression von FOXP3 in T-Helferzellen und soll so die Entstehung der umstrittenen iTreg Zellen (s. unten) fördern [70].

Des Weiteren setzen Treg sowohl intra-, als auch extrazellulär Adenosin frei, welches durch die Ektozyme CD39 und CD73 auf den Treg zu perizellulärem Adenosin katalysiert wird. Dieses führt über den auf aktivierten T-Helferzellen vorkommenden Adenosin-Rezeptor 2A zu deren Suppression [71-73].

Treg können aber auch zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) über *gap junctions* in der Zellmembran der Zielzelle an diese weitergeben. In der Zielzelle unterdrückt dieses als *second messenger* über die Induktion von *inducible cAMP early repressor* (ICER) die IL-2 Produktion und damit die Aktivität der Zellen [74].

Kontrovers diskutiert werden hingegen die zytotoxischen Mechanismen, mit Hilfe derer Treg durch direkten Zell-Zell-Kontakt suppressiv agieren. Hier sei einerseits der Perforin- bzw. Granzymsignalweg genannt, über den sie möglicherweise andere Zellen lysieren können und damit auch aktivierte T-Zellen (und B-Zellen) an ihrer Proliferation hindern könnten [75]. Andererseits steht zur Debatte ob sie über den Liganden TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand*)/DR5 (*death receptor 5*) den Zelltod von T-Helferzellen bewirken [76].

Wie bereits angedeutet beschränkt sich die Suppression durch Treg hierbei nicht nur auf CD4⁺ T-Helferzellen, sondern erstreckt sich u.a. auch auf CD8⁺ zytotoxische T-Zellen [77], B-Zellen (Hemmung von Isotypenwechsel und Immunglobulinproduktion) [78, 79], Mastzellen (Inhibition der Degranulierung) [80] und NK- sowie NKT-Zellen (Hemmung der zytotoxischen Aktivität) [81, 82].

Auf indirektem Wege modulieren Treg das Immunsystem, indem sie auch mit DC interagieren [83-85]. Treg exprimieren LAG-3 (*lymphocyte-activation gene 3*) welches an MHCII-Moleküle auf reifen DC bindet und damit deren weitere Reifung und immunstimulatorische Fähigkeit hemmt [86]. Durch Interaktion zwischen CTLA-4 auf Treg und CD80/86 auf APC können letztere (wie oben beschrieben) supprimiert werden [87, 88], wodurch wiederum deren Fähigkeit zur Aktivierung weiterer T-Helferzellen verhindert wird. Als infektiöse Toleranz bezeichnet man die Beobachtung, dass DC nach Kontakt mit nTreg weitere T-Zellen induzieren können, welche immunsupprimierende Zytokine produzieren [89].

Die Existenz von iTreg *in vivo* ist jedoch weiter umstritten. Es gibt Daten die darauf hindeuten, dass möglicherweise unter lokalen, peripheren Einflüssen iTreg entstehen. Das Zytokinmilieu soll hierbei eine entscheidende Rolle spielen. Diese Differenzierung ist ausgehend von T-Helferzellen anderer Spezifität oder von naiven T-Helferzellen möglich [90], relevante Populationen wurden *in vivo* bis jetzt jedoch nur im Darm oder im Mausmodell der Kolitis nachgewiesen.

In Mäusen wurde gezeigt, dass sich beide Gruppen von Treg bezüglich des Phäno- und Genotyps sehr ähnlich sind und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Proliferation anderer T-Helferzellen unterdrücken können [91-93]. Aus humanen naiven CD4⁺ Zellen (und bedingt auch aus differenzierten Zellen anderen T-Helferzelllinien) wurden *in vitro* durch TGFβ CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg induziert. TGFβ bewirkt dabei (bei ebenfalls erfolgter TCR-Stimulation) die verstärkte Expression von sowohl FOXP3 als auch RORγ(t) [94]. Die Zellen besitzen dann das Potential in Richtung iTreg oder Th17-Zelle zu differenzieren (vergleiche oben). Im proinflammatorischen Milieu (IL-6, IL-21, oder IL-23) und bei niedrigen Konzentrationen an TGFβ differenzieren sie zu Th17 Zellen [94]. Dies geschieht durch eine weiter verstärkte Expression von RORγ(t) und die Suppression der FOXP3-Expression und Funktion. Hohe Konzentrationen an TGFβ und ein Fehlen an proinflammatorischen Zytokinen hingegen führen über eine hohe Expression von FOXP3 zur Entstehung von iTreg [95].

Ob die Induktion von iTreg durch TGFβ unter physiologischen Bedingungen *in vivo* stattfindet, ist bis jetzt jedoch ungeklärt. Die funktionelle Aktivität dieser Zellen ist jedenfalls umstritten [70, 96] und ihre suppressiven Eigenschaften sind nicht vollständig geklärt, zumal auch auf epigenetischer Ebene Unterschiede zwischen nTreg und iTreg nachgewiesen wurden. Nur nTreg zeigten sich in einer bestimmten Region des FOXP3 Genlocus, der TSDR (*Treg-specific demethylated region*) demethyliert, während dies auf transient FOXP3 positiven CD4⁺ Zellen und TGFβ induzierten Treg nicht der Fall war [97, 98]. TSDR ist eine nicht kodierende Enhancer-Sequenz des FOXP3 Locus, welcher eine wichtige Rolle zur anhaltenden Treg Stabilität zugeschrieben wird [99, 100].

1.4 T-Zellplastizität

In den letzten Jahren änderte sich die Ansicht über das ursprüngliche Modell einer festen Zugehörigkeit von CD4⁺ T-Lymphozyten zu bestimmten Subpopulationen und deren damit einhergehenden assoziierten Eigenschaften. Dieses Modell entstand durch die Auswertung von *in vitro* Arbeiten mit T-Zellklonen. Es zeigte sich jedoch, dass diese Differenzierungen vermutlich nicht starr sind, sondern dass Zellen auch nach längerer *in vitro* Kultur immer noch in der Lage sind, ihren Phänotyp zu ändern, nämlich dann, wenn sie entsprechend anderen polarisierenden Bedingungen ausgesetzt sind. *In vitro* Untersuchungen zeigten so unter anderem, dass generierte Th17 Zellen auch nach 3 Wochen noch zu Th1 bzw. Th2 Zellen konvertieren, sobald sie einem IL-12- bzw. IL-4-reichen Milieu ausgesetzt werden [101, 102]. In Gegenwart von TGFβ blieb die IL-17A und IL-17F Expression jedoch erhalten [102].

Ex vivo wurde sogar innerhalb von *memory* T-Zellen eine grundlegende Plastizität in der Expressionsregelung und Modulationsmöglichkeit des Funktionsprogramms nachgewiesen

[103]. Beispielsweise können ausdifferenzierte Th2 Zellen unter bestimmten Voraussetzungen zu „Th2+1“ Zellen reprogrammiert werden, welche *in vivo* über Monate typische Charakteristika beider Zelllinien vereinigen. Sie produzieren IL-4 sowie IFN γ und exprimieren sowohl GATA3 als auch T-bet [104]. Werden bereits ausdifferenzierte Th1 bzw. Th2 Zellen *in vitro* unter ihrem Phänotyp entgegengesetzten Bedingungen stimuliert (IL-4 für Th1 bzw. IL-12 für Th2), erlangen sie auch dann noch die Möglichkeit sowohl IL-4 als auch IFN γ zu produzieren [105].

Das Modell, welches ursprünglich aus *in vitro* Kulturen entstand, ist jedoch nicht uneingeschränkt auf die Situation *in vivo* übertragbar. Zwar finden sich *in vivo* Zellen, die dem entsprechenden Zytokinmuster und Transkriptionsfaktorexpressionsmuster der beschriebenen „T-Helferzelllinien“ entsprechen, es gibt jedoch auch Beispiele für Zellen welche gleichzeitig liniendefinierende Zytokine und Transkriptionsfaktoren mehrerer unterschiedlicher T-Helferzelllinien exprimieren. Schon seit der Entdeckung von Th1 und Th2 Zellen ist so das Vorhandensein von sogenannten Th0 Zellen bekannt, welche simultan IL-4 und IFN γ produzieren [103] und auch T-Helferzellen mit Koexpression von IL-17 und IFN γ wurden beschrieben [106, 107]. Im Menschen wurden zwei unterschiedliche pathogen-spezifische Typen von IL-17-produzierenden Zellen beschrieben: Die *Candida albicans*-spezifischen IL-17 Zellen produzieren hierbei neben IL-17 auch IFN γ und die linienspezifischen Transkriptionsfaktoren T-bet und ROR γ (t) [108].

Ob diese Zellen nun ein Ausdruck von „Zwischenstufen“ in der Zelldifferenzierung sind oder ihr Vorhandensein bedeutet, dass die *in vitro* definierten „Linien“ eben doch keine sind, ist unklar. In Zusammenschau der bisher bekannten Daten scheint jedoch auf jeden Fall eine gewisse Flexibilität in der Differenzierung zu existieren, so dass den CD4⁺ T-Zellen zunächst verschiedene Differenzierungswege offen stehen, während diese möglicherweise zu einem späteren Zeitpunkt unwiderruflich festgelegt sind [103]. Unter Beachtung der Tatsache, dass im menschlichen System eine erhebliche Anzahl von *memory* T-Zellen ohne Linienzugehörigkeit existiert und die meisten Zellen eine Flexibilität hinsichtlich ihres Zytokinrepertoires beibehalten, ist es naheliegend zu vermuten, dass in einer Zelle zu verschiedenen Zeitpunkten in unterschiedlichen Geweben die Expression gegensätzlicher Zytokinmuster induziert werden kann. IL-17-produzierende Zellen befinden sich z.B. in großer Zahl in der Lamina propria des Gastrointestinaltrakts, wo sie durch kommensale Bakterien induziert werden und an der Aufrechterhaltung der epithelialen Integrität sowie der Bekämpfung von extrazellulären Pathogenen beteiligt sind [109-111]. *Steady-State* Th17 Zellen könnten, durch die Kapazität ihr Zytokinprofil anzupassen, nach Bedarf zur Elimination sehr unterschiedlicher Pathogene beitragen. Ein schneller Wechsel zu Th1-ähnlichen Zellen könnte so beispielsweise eine effiziente lokale Abwehr gegen intrazelluläre Pathogene garantieren.

1.5 Bedeutung der regulatorischen T-Zellen für die klinische Medizin

Treg und ihre suppressiven Eigenschaften sind zum einem für das immunsuppressive Milieu im Tumor mitverantwortlich (und hemmen auch bis zu einem gewissen Grad die Immunantwort gegen Pathogene, wodurch es durch fehlende Erregerelimination zu chronischen Infektionen kommen kann) [112], andererseits verhindern sie aber auch überschießende Immunantworten und damit einhergehende Gewebeschäden. In der Tumorthherapie setzt man daher vermehrt auf eine Eliminierung der Zellen [113], während man bei Autoimmunerkrankungen eher versucht sie in Zahl und Aktivität zu verstärken [114]. In Tiermodellen konnte hier auch bereits erfolgreich gezeigt werden, dass der adoptive Transfer dieser Zellen vor Typ I Diabetes schützt [115, 116] sowie eine bestehende Arthritis [117] bzw. Kolitis [118] heilen kann.

Der präventive und therapeutische Einsatz von Treg wird besonders nach allogener Organtransplantation [119] und im Bereich der allogenen Stammzelltransplantation untersucht [120, 121].

Die allogene Stammzelltransplantation (SZT) wird heute vor allem zur Therapie maligner, aber auch einiger nichtmaligner Erkrankungen angewendet. Hierzu wird das erkrankte hämatopoetische System des Empfängers durch das gesunde Blutsystem eines Spenders ersetzt (allogene SZT). Die Tumorzellen werden dabei zunächst durch aggressive Therapien, wie die myeloablative Ganzkörperbestrahlung und/oder die Hochdosis-Chemotherapie, eliminiert (Konditionierungstherapie). Durch die Zerstörung der Blut- und Krebszellen des Empfängers werden einerseits das *Engraftment* des Transplantats (Einnistung von hämatopoetischen Spenderzellen ins Knochenmark) ermöglicht und die maligne Grunderkrankung des Patienten bekämpft [122], andererseits wird auch das hämatopoetische System des Patienten zerstört, welches durch das eines passenden Spenders ersetzt wird. Die Auswahl eines geeigneten Spenders stellt bei der SZT eine große Herausforderung der modernen Medizin dar. Die MHC-Moleküle (Hauptgewebeverträglichkeitskomplex), beim Menschen HLA (*human leukocyte antigen*)-System genannt, spielen hierbei eine entscheidende Rolle. Sie dienen zur Erkennung körpereigener Zellen durch das Immunsystem und damit sowohl der Gewebeverträglichkeit, als auch der Abwehr fremder oder veränderter Zellen. Nach einer erfolgreichen Transplantation kann durch Inkompatibilitäten der HLA-Moleküle von Spender und Empfänger eine Immunantwort gegen HLA-Moleküle des Empfängers ausgelöst werden. Diese Immunantwort richtet sich dabei nach der Transplantation sowohl gegen das HLA-Molekül des Empfängers als auch daran gebundene Peptide. Der Anteil der alloreaktiver T-Zellen (alloreaktiv = Reaktion von Zellen eines Individuums gegen Zellen eines anderen Individuums der gleichen Art), welche allogene MHC-Moleküle potentiell erkennen können, liegt mit 10% sehr hoch [123]. Zur

Vermeidung von Transplantationskomplikationen wurde daher die HLA-Typisierung eingeführt, um eine möglichst hohe Übereinstimmung von Spender- und Empfängersystem zu erreichen. Durch die Typisierung reduziert sich das Auftreten von Komplikationen zwar erheblich, ein Screening auf Minorhistokompatibilitätsantigene ist jedoch noch nicht vorhanden. Diese Antigene sind Proteine auf Zelloberflächen welche auch bei HLA-identen Individuen unterschiedlich sein können und nach Transplantation häufig Auslöser einer Immunantwort sein können [124].

Insbesondere die reifen, alloreaktiven T-Zellen im Transplantat spielen nach der Transplantation eine wichtige Rolle. Sie sorgen einerseits durch die Zerstörung verbleibender Tumorzellen für eine erfolgreiche Tumoreradikation (*Graft-versus-leukemia*, GvL), andererseits können sie auch Gewebsstrukturen des Patienten angreifen (*Graft-versus-Host Disease*, GvHD). Eine Depletion dieser Zellen führte jedoch in Experimenten nicht nur zur Transplantatabstoßung, sondern auch zu Rezidiven der malignen Grunderkrankung und einer erhöhten Rate an opportunistischen Infektionen [122, 125].

Die GvHD stellt heutzutage neben opportunistischen Infektionen die größte Komplikation nach einer allogenen SZT dar. Bei der GvHD infiltrieren alloreaktive Spender T-Zellen Zielorgane wie die Haut, die Leber oder den Darm und schädigen diese. Man unterscheidet hierbei die chronische Form, welche in der Regel frühestens 100 Tage nach Transplantation auftritt, von der akuten Form, welche in der Zeit davor ausbricht [126, 127]. Bei der Entstehung der akuten GvHD treffen gesunde Spenderlymphozyten auf Empfängergewebe welche erheblich durch die Krankheit selbst, vorangehende Infektionen und die Konditionierung beschädigt wurden [128]. Die genannten Umstände führen in den betroffenen Geweben zu Veränderungen der endo- und epithelialen Zellen, sodass die Spenderzellen nicht nur auf eine fremde, sondern auch auf eine geschädigte, hoch immunaktivierende Umgebung treffen [129].

Während der drei Phasen der akuten GvHD greifen mehrere Mechanismen ineinander (Abbildung 3).

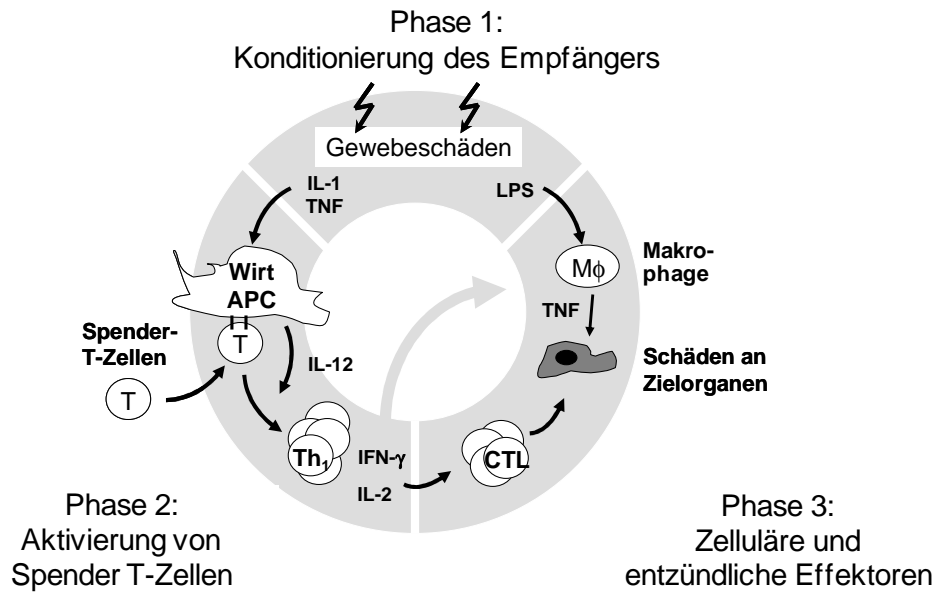


Abbildung 3: Modell zur Pathophysiologie der akuten GvHD

Phase 1: Während der Konditionierung des Patienten entstehen an den Zielgeweben Schäden, welche diese für Spenderzellen angreifbarer machen. Empfänger APC werden aktiviert.

Phase 2: Die T-Zellen des Spenders werden aktiviert, dadurch differenzieren und migrieren sie in die betroffenen Zielgewebe.

Phase 3: In der Effektor-Phase werden weitere Immunzellen aktiviert, unter anderem auch durch weitere bakterielle Infektionen und es kommt zum Untergang des betroffenen Gewebes.

Modifiziert nach [128].

Die geschädigten Gewebe produzieren durch das Zusammentreffen alloreaktiver Spender-T-Zellen und dem bereits geschädigten Rezipientengewebe große Mengen inflammatorisch wirksamer Zytokine wie TNF- α und IL-1, was auch als „cytokine storm“ beschrieben wird [128, 130]. Hierdurch werden aktivierte Empfängerzellen zur Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine angeregt [130]. Die Immunzellen, sowohl des Empfängers als auch des Spenders, werden weiter aktiviert. Es findet eine vermehrte Expression von HLA, Adhäsionsmolekülen und kostimulatorischen Molekülen statt [128]. Durch diese Vorgänge werden sowohl Spender-, als auch Empfänger-APC aktiviert. Eine besondere Rolle spielt hier auch die Schädigung des Verdauungstraktes. Eine Translokation von bakteriellen immunstimulatorischen Bestandteilen, wie z.B. LPS (Lipopolysaccharide), steigert die Aktivierung von Empfänger-APC. Nach einer allogenen SZT finden sich in den sekundär lymphatischen Organen sowohl APC vom Spender, als auch verbleibende APC vom Empfänger [131, 132]. Die TCR der transplantierten T-Zellen können in der Regel mit den MHC-Molekülen beider APC interagieren. Man unterscheidet bei der Erkennung und Initiierung der folgenden Immunantwort daher zwei unterschiedliche Wege, die direkte und die indirekte Erkennung inkompatibler MHC-Moleküle [133]. Beim direkten Weg treffen Spender-T-Zellen auf aktivierte Empfänger-APC, welche ihnen mit Peptiden beladene HLA-Moleküle präsentieren. Der TCR erkennt dabei entweder das allogene MHC-Molekül peptidunabhängig [134, 135] oder das im allogenen MHC-Molekül gebundene Peptid.

Werden Peptide des MHC-Moleküls des Empfängers von Spender APC präsentiert und vom TCR der Spender-T-Zelle erkannt, handelt es sich um den indirekten Weg der Erkennung inkompatibler MHC-Moleküle. Die für eine weitere Aktivierung notwendigen kostimulatorischen Moleküle werden durch die Ausgangsbedingungen bereits vermehrt exprimiert. Folglich werden transplantierte T-Zellen im proinflammatorischen Milieu durch APC leicht aktiviert und migrieren als Effektorzellen in das geschädigte Zielgewebe [136]. Hier findet eine weitere Aktivierung des angeborenen und adaptativen Immunsystems statt, welches wiederum zu einer weiteren Gewebeschädigung führt.

Um die GvHD zu kontrollieren ist eine Immunsuppression des Empfängers nötig. Diese erfolgt bisher vor allem durch pharmakologische immunsuppressive Therapie, welche jedoch nicht immer erfolgreich ist und die erwünschte Antitumorstimmung (GvL) negativ beeinflussen kann. Zudem prädisponiert die medikamentöse Immunsuppression für weitere Komplikationen wie opportunistische Infektionen und Wachstumsstörungen, insbesondere der jüngsten Patienten [137].

Die Auswertung klinischer Daten von Patienten zeigte, dass Inzidenz und Schweregrad der GvHD invers mit der Treg Anzahl im peripheren Blut des Empfängers nach SZT sowie derjenigen im peripheren Blut des entsprechenden Spenders korreliert [138, 139]. Somit lag es nahe, durch den adoptiven Transfer von Treg GvHD vorzubeugen oder diese zu behandeln. Der adoptive Transfer stabiler Treg, welche ihre suppressiven Eigenschaften beibehalten, zeigte in präklinischen sowie inzwischen auch in klinischen Studien zur GvHD-Prophylaxe große Erfolge [61, 121, 140-143]. In präklinischen Studien führte die Gabe von Treg im 1:1 Verhältnis zu konventionellen T-Zellen zu einem Schutz vor GvHD bei bleibendem GvL-Effekt. Die Anwendung von Treg-Zellprodukten beim Menschen wird jedoch durch die Seltenheit von Treg im peripheren Blut erschwert. Nabelschnurblut als Transplantatquelle induziert aufgrund seines höheren Anteils naiver T-Zellen zwar mit geringerer Wahrscheinlichkeit schwere GvHD, ist durch seine beschränkte Verfügbarkeit für den erwünschten Therapieumfang und je nach Indikation der Transplantation allerdings bisher weniger geeignet. Daher war es nötig eine *in vitro* Expansion von Treg, welche von dem jeweiligen Spender gewonnen werden, zu ermöglichen [144, 145]. In klinischen Studien fand die Aufreinigung von menschlichen Treg Zellprodukten zur Transplantation, nach den entsprechenden GMP-Richtlinien, mittels magnetischer Zellseparation statt. Mit dieser Methode werden jedoch lediglich Produkte mit einem Reinheitsgrad an Treg von ca. 50% erreicht. Auch hier wurden, bei einem entsprechenden ähnlichen Verhältnis von konventionellen Zellen zu Treg, gute Resultate erzielt. Da der Rest des Zellproduktes jedoch einen hohen Anteil an proinflammatorischen T-Helferzellen enthält, ist diese Methode der Aufreinigung zur Therapie der GvHD ungeeignet. Hierzu wird ein deutlich höherer Anteil von

Treg benötigt, da sonst die Gefahr einer Verstärkung der schon vorhandenen GvHD durch die Verabreichung zusätzlicher konventioneller T-Zellen besteht.

Um diesem Problem zu entgehen war die Entwicklung eines Protokolls zur *in vitro* Vermehrung von Treg aus dem peripheren Blut nötig (siehe Kapitel 3.2.4). Es zeigte sich, dass *in vitro* expandierte Treg den gleichen immunsuppressiven Effekt wie frisch isolierte Zellen aufweisen [61]. Jedoch wurden $CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$ Zellen nach *in vitro* Expansion zu einem großen Teil FOXP3⁻ und verloren damit auch ihre für die Therapie essentiellen suppressiven Eigenschaften. Dies konnte auch auf genetischer und epigenetischer Ebene nachgewiesen werden [99, 146]. Die Verwendung intrazellulärer Marker bzw. genetischer und epigenetischer Marker zum Erhalt einer Ausgangspopulation für die *in vitro* Expansion, welche auch nach Expansion stabile Eigenschaften besitzt, ist aufgrund der Präparationsmethoden der Zellen jedoch nicht möglich.

Die Entdeckung, dass $CD45RA^+$ Treg (also die Gruppe der naiven Treg), welche wahrscheinlich den Thymus erst kürzlich verlassen haben, die Gruppe stabiler Treg darstellen, brachte einen entscheidenden Durchbruch. Ihre FOXP3-Expression bleibt auch nach dreiwöchiger *in vitro* Expansion nahezu vollständig erhalten [99], während isolierte $CD45RA^-$ Treg nicht nur FOXP3 verlieren, sondern auch weitere epigenetische Veränderungen durchlaufen. Daher scheinen $CD45RA^+$ Treg die bestmögliche Ausgangspopulation für die Herstellung adoptiver Treg Zelltherapieprodukte nach *in vitro* Expansion darzustellen [147]. Entsprechende Protokolle für Isolierung und zuverlässige *in vitro* Expansion humaner Treg wurden bereits von der Arbeitsgruppe Edinger und Hoffmann entwickelt und publiziert [148].

2 Zielsetzung

CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatorische T-Zellen sind wichtig für die Balance zwischen Inflammation und Toleranz innerhalb des menschlichen Immunsystems. Sie werden zunehmend in klinischen Studien zur Prophylaxe bzw. Therapie der Graft-versus-Host Erkrankung nach allogener Stammzelltransplantation sowie im Rahmen der Behandlung von Autoimmunerkrankungen eingesetzt. Aufgrund der geringen Zahl humaner Treg im peripheren Blut ist für den adoptiven Transfer die vorangehende *in vitro* Expansion erforderlich. Hierbei ist der Erhalt der immunsuppressiven Eigenschaften nach der Expansion von entscheidender Bedeutung. Die Subpopulation der Treg, welche nach der Isolation aus dem peripheren Blut einen *memory*-Phänotyp aufweist (CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺CD45RA⁻), zeigt im Verlauf einer *in vitro* Expansion keinen stabilen Phänotyp: Die Zellen verlieren zum Teil die Expression des liniendefinierenden Transkriptionsfaktors FOXP3 und damit auch ihre suppressive Wirkung. Sie sind für den klinischen Einsatz potentiell gefährlich, da bisher unklar ist, was aus diesen Zellen entsteht.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, instabile Treg möglichst detailliert (immunophänotypisch, funktionell und molekularbiologisch) zu charakterisieren; auch im Vergleich zu den Zellen, die FOXP3 in der Kultur behalten. So soll in Zukunft deren potentiell Risiko als Kontamination von Treg Produkten für den adoptiven Transfer eingeschätzt werden können.

Diese Untersuchungen waren bisher nicht möglich, da keine geeigneten Protokolle zur Verfügung standen, die eine Färbung von FOXP3 mit nachfolgender RNA-Extraktion/Untersuchung erlaubten. Mittels Mehrfarben-Durchflusszytometrie werden in dieser Arbeit nukleäre Transkriptionsfaktor- und intrazytoplasmatische Zytokinexpression sowohl in PBMC als auch in *in vitro* expandierten Treg untersucht. Dies ermöglicht einen komplexen Einblick in die Selektivität designierter „Masterregulatoren“ und die Auswahl geeigneter Marker zur Charakterisierung definierter Differenzierungsstadien im T-Helferzell-kompartiment. Mithilfe neuer Färbeprotokolle soll die RNA-Isolation aus *in vitro* expandierten und spezifisch für FOXP3 FACS-separierten humanen Treg ermöglicht werden. Anschließende Microarray-basierte Transkriptomanalysen ermöglichen den Vergleich stabiler und instabiler humaner Treg-Populationen während *in vitro* Expansion in bisher einzigartiger Komplexität. Hierdurch sollen neue Erkenntnisse über die Plastizität humaner T-Zellen (im speziellen Treg) gewonnen werden und spezifische Marker für Treg nach *in vitro* Expansion identifiziert werden. Diese Untersuchungen sind wichtig für die Expansion und den erfolgreichen Einsatz von Treg Produkten in der klinischen Forschung.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
30µm Zellfilter, Vorseparationsfilter	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
500ml Filtersystem	Corning Incorporated, NY
DNA Lo Bind Tube PCR clean (0,5ml, 1,5ml)	Eppendorf, Hamburg
Einmalpipetten (5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	Corning Incorporated, NY
Eppendorf Cups (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Erlenmeyerkolben (50ml, 200ml)	VWR International, Ismaning
Filterspitzen	Ratiolab, Dreieich
Flachbodenplatten (6-, 24-, und 96-Loch)	Falcon TM , Becton Dickinson (heute: Corning Incorporated), Heidelberg
Glas-Pasteurpipetten (230mm)	VWR International, Ismaning
MACS Separationssäulen (MS, LS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikro-Schraubröhre (2ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrozellulosemembran Protran BA85 (Poren 0,45µm)	Schleicher und Schuell, Dassel
Objektträger Superfrost	Menzel-Gläser, Braunschweig
Pipetten (1-10µl, 2-200µl, 50-1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Polypropylenröhrchen (15ml, 50ml, 250ml)	Falcon TM , Becton Dickinson (heute: Corning Incorporated), Heidelberg
Polystyrolröhrchen (4ml, 12ml)	Falcon TM , Becton Dickinson (heute: Corning Incorporated), Heidelberg
Zellkulturflaschen (25cm ² , 75cm ²)	Corning Incorporated, NY

3.1.2 Antikörper gegen humane Antigene

Alle Antikörper, die in den folgenden Tabellen aufgeführt werden, wurden gemäß den Herstellerangaben verwendet. Einzusetzende Antikörperkonzentrationen wurden individuell im Labor titriert.

Tabelle 2: AF 488-markierte anti-human Antikörper

Antikörper	Hersteller	Klon	Isotyp
IL-17A	eBioscience, San Diego (CA)	64DEC17	Mouse IgG1, κ

Tabelle 3: Alexa Fluor 647-markierte anti-human Antikörper

Antikörper	Hersteller	Klon	Isotyp
FOXP3	eBioscience	PCH101	Rat IgG2a, κ
T-bet	eBioscience	eBio4B10	Mouse IgG1, κ

Tabelle 4: Allophycocyanin-markierte anti-human Antikörper

Antikörper	Hersteller	Klon	Isotyp
CD3	BD Biosciences (BD), Heidelberg	UCHT1	Mouse IgG1, κ
CD4	BD	SK3	Mouse IgG1, κ
CD25	BD	2A3	Mouse IgG1, κ
CD56	BD	B159	Mouse IgG1, κ
FOXP3	eBioscience	PCH101	Rat IgG2a, κ
IFN γ	BD	B27	Mouse IgG1, κ
IL-4	eBioscience	8D4-8	Mouse IgG1, κ
IL-17A	eBioscience	eBio64DEC17	Mouse IgG1, κ

Tabelle 5: eFluor450-markierte anti-human Antikörper

Antikörper	Hersteller	Klon	Isotyp
CD8	eBioscience	OKT8	Mouse IgG2a, κ
FOXP3	eBioscience	PCH101	Rat IgG2a, κ

Tabelle 6: FITC-markierte anti-human Antikörper

Antikörper	Hersteller	Klon	Isotyp
CD3	BD	SK7	Mouse IgG1, κ
CD4	BD	SK3	Mouse IgG1, κ
CD19	BD	4G7	Mouse IgG1, κ
CD45RA	BD	L48	Mouse IgG1, κ
IFN γ	BD	B27	Mouse IgG1, κ
IL-13	eBioscience	PVM13-1	Mouse IgG1, κ
IL-17A	eBioscience	eBio64DEC17	Mouse IgG1, κ

Tabelle 7: Pacific Blue-markierte anti-human Antikörper

Antikörper	Hersteller	Klon	Isotyp
CD4	BD	RPA-T4	Mouse IgG1, κ
FOXP3	eBioscience	PCH101	Rat IgG2a, κ

Tabelle 8: PE-markierte anti-human Antikörper

Antikörper	Hersteller	Klon	Isotyp
CD3	BD	SK7	Mouse IgG1, κ
CD4	BD	SK3	Mouse IgG1, κ
CD25	BD	M-A251	Mouse IgG1, κ
CD56	BD	B159	Mouse IgG1, κ
CD127	BD	hIL-7R-M21	Mouse IgG1, κ
FOXP3	eBioscience	PCH101	Rat IgG2a, κ
GATA3	eBioscience	TWAJ	Rat IgG2b, κ
IFN γ	BD	B27	Mouse IgG1, κ
ROR γ (t)	BD	Q21-559	Mouse IgG2b, κ
ROR γ (t)	eBioscience	AFKJS-9	Rat IgG2a, κ

Tabelle 9: PerCP-markierte anti-human Antikörper

Antikörper	Hersteller	Klon	Isotyp
CD4	BD	SK3	Mouse IgG1, κ

Tabelle 10: PE-Cy7-markierte anti-human Antikörper

Antikörper	Hersteller	Klon	Isotyp
CD4	BD	SK3	Mouse IgG1, κ
CD25	BD	2A3	Mouse IgG1, κ

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 11: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
3-N-Morpholinpropansulfonsäure (MOPS)	AppliChem, Darmstadt
4',6 Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Lösung 1mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Accudrop-Beads	BD, Heidelberg
Agarose	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-PE Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Aqua dest.	Braun, Melsungen
β -Mercaptoethanol (Lösung, 50 μ M)	GibcoBRL Invitrogen, Karlsruhe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC, >97%)	Roth, Karlsruhe
Ethanol absolut (100%)	J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Griesheim
Ethidiumbromid	Invitrogen, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, 1M)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäuredinatriumsalz (Pulver)	Roth, Karlsruhe
FACS-Clean	BD, Heidelberg
FACS-Flow	BD, Heidelberg
FACS-Rinse	BD, Heidelberg
Ficoll (Lymphozytenseparationsmedium)	Biochrom, Berlin Pharmacia, Freiburg Sigma-Aldrich, Steinheim
Formaldehydlösung (37%)	Merck, Darmstadt
Formamid (deionisiert)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fötales Rinderserum (FCS)	PAA Laboratories, Linz (Österreich)
Glykogenlösung (2%)	Roche, Mannheim
Humanalbumin Alburnorm (HA) (20%)	Octapharma, Langenfeld
Hydroxyethylpiperatin-Ethansulfonsäurepuffer (HEPES, 1M)	PAN, Aidenach
Isopropyl/Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin (Lösung, 200mM)	PAN, Aidenach
Methanol (100%)	Merck, Darmstadt

Minimal essentielles Medium (MEM)-Vitamine	PAN, Aidenach
Natriumacetat	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (1N)	Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat (100mM)	PAN, Aidenach
Nichtessentielle Aminosäuren (NEAA)	PAN, Aidenach
PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, D-PBS, ohne Ca und Mg)	PAA Laboratories, Linz (Österreich)
Penicillin (10mg/ml)/Streptomycin (0,85%)	GibcoBRL Invitrogen, Karlsruhe
Propidiumiodid (PI, Lösung 1mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rattenserum	AbD Serotec, Düsseldorf
RNasin RNase Inhibitor (20–40U/µl)	Promega, Madison (WI)
RPMI 1640 Medium (ohne L-Glutamin)	Lonza, Verviers (Belgien)
TRIzol Reagenz	Invitrogen, Darmstadt
Trypanblaulösung (0,4%)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypton	Roth, Karlsruhe
Türks Lösung	Merck, Darmstadt
Whole Human Genome Expression Array G4851A (8360K)	Agilent Technologies, Böblingen

3.1.4 Enzyme, Stimulanzen und Kits

Alle Kits wurden, wenn nicht anders angegeben, nach den Herstellervorgaben verwendet.

Tabelle 12: Enzyme, Stimulanzen und Kits

Enzyme, Stimulanzen und Kits	Hersteller
anti-human-CD28 (Klon CD28.2)	BD, Heidelberg
anti-human-CD3 (Klon OKT3)	Janssen-Cilag, Neuss
FOXP3 Färbekit	eBioscience, San Diego (CA)
GolgiStop	BD, Heidelberg
IL-2 (Proleukin S)	Novartis, Nürnberg
Ionomycin	Enzo Life Sciences, Lörrach
One Color Low Input Quick Amp Labeling Kit	Agilent Technologies, Waldbronn
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Merck, Darmstadt
RNA 6000 Nano Lab Chip® Kits	Agilent Technologies, Waldbronn
RNeasy Micro Kit	Qiagen, Hilden

3.1.5 Geräte und Ausrüstung

Tabelle 13: Geräte und Ausrüstungsgegenstände

Geräte und Ausrüstung	Hersteller
Absauger N811 KN.18	KNF Neuberger, Freiburg
Agilent Bioanalyzer	Agilent Technologies, Böblingen/Palo Alto (CA)
Autoklav Varioklav 75S Compact	HP, Oberschleißheim
Bestrahlungsgerät für Zellen IBL437C	CIS Bio International, Gif-Sur-Yvette (Frankreich)
Brutschränke Hera Cell 240, BBD6220	Heraeus, Hanau

Elektrophoresekammer und Kämme (1,0mm)	Serva, Heidelberg
FACS Calibur	BD, Heidelberg
FACSAria	BD, Heidelberg
LSRII	BD, Heidelberg
Magnetseparator MPC™-6	Invitrogen/Dynal, Oslo (Norwegen)
Midi-MACS System (Halter und Magnet für Midi-Säulen)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
Nanodrop 1000 Spektrophotometer	PEQLAB Biotechnologie, Darmstadt
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen oder Blau Brand, Wertheim
Pipetboy acu	Integra Biosciences and Corporation, Fernwald
Sterilwerkbänke HS18, KS15	Heraeus, Hanau
Typhoon 9200 Variable Mode Imager (50microns+3mm)	Amersham Pharmacia Biotech Inc.- Molecular Dynamics Div., Piscataway (NJ)
Vortexer Genie 2	Scientific Industries, NY
Zentrifuge 6K15	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zentrifuge Mikro200R	Hettich, Tuttlingen

3.1.6 Medien, Puffer und Lösungen

Tabelle 14: Medien, Puffer, Lösungen und deren Zusammensetzungen

Medien, Puffer, Lösungen	Zusammensetzung
ACK-Puffer (6x)	Ammoniumchlorid 24,82g (0,155M) Kaliumhydrogencarbonat 3,00g (0,1M) EDTA-Dinatriumsalz 0,111g (0,1M) Mit Aqua dest. lösen, auf pH 7,4 einstellen, mit Aqua dest. auf 500ml auffüllen und steril filtrieren. Für 1xACK-Puffer mit Aqua dest. verdünnen.
DEPC-H ₂ O	1ml DEPC in 1l Aqua dest. geben (0,1%). Die Lösung gut mischen und über Nacht unter dem Abzug stehen lassen. Am nächsten Tag, zur vollständigen Entfernung des noch vorhandenen DEPC, autoklavieren.
FACS-Puffer	2% FCS in PBS
Komplettes RPMI (cRPMI)	RPMI1640 Medium mit: FCS 10% L-Glutamin 2mM Penicillin 100U/ml Streptomycin 100µg/ml NEAA 1% β-Mercaptoethanol 0,05mM Natriumpyruvat 1mM HEPES 10mM MEM-Vitamine 2ml/500ml

MACS-Puffer	PBS mit: EDTA 2mM FCS 1% Puffer über 500ml Filtersystem filtrieren und entgasen.
MOPS Konzentrat (20x)	Für 500ml Konzentrat: DEPC-H ₂ O 300ml MOPS 42g (400mM) Natriumacetat (H ₂ O frei) 4,1g (100mM) EDTA 3,7g (20mM) mit DEPC-H ₂ O auf 500ml auffüllen, mit Natriumhydroxid auf pH 7,0 einstellen und dunkel lagern.
Tryptonpuffer	Trypton 5g (1%)/10g (2%)/25g (5%) in 500ml PBS lösen, 500µl DEPC (0,1%) hinzugeben und über Nacht unter dem Abzug stehen lassen, anschließend autoklavieren.
RNA-Probenpuffer/ <i>loading dye</i>	Formamid, deionisiert 10ml (50%) Formaldehyd 37% 3,5ml (2,2M) MOPS (20x) 1ml (1x) Bromphenolblau (1% in H ₂ O) 0,8ml (0,04%) Ficoll 0,2g (1%) Mit Aqua dest. auf 20ml auffüllen, in 1ml Aliquots bei -20°C lagern. Vor Benutzung 5µl Ethidiumbromid (10mg/ml) pro ml Probenpuffer hinzugeben.

3.1.7 Software

Tabelle 15: Software

Software	Hersteller
BD FACS DIVA (LSRII) Software	BD, Heidelberg
CellQuest Pro (Calibur) Software	BD, Heidelberg
EndNote X5	Thomson Reuters, NY
FlowJo Software 9	Tree Star Inc., Ashland (OR)
GeneSpring GX	Agilent Technologies, Böblingen
Microsoft Office 2007	Microsoft Deutschland
SPSS Statistics15.0	SPSS, Chicago (IL)
R Version 2.15.3	http://www.R-project.org
VassarStats	http://vassarstats.net

3.2 Methoden

3.2.1 Isolation mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut

Die Isolation mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) findet mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Leukapheresematerial statt. Dieses stammt von der Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg und wird ausschließlich von gesunden Spendern gewonnen. Die Leukapherese erfolgt nach Aufklärung und Einwilligung am Universitätsklinikum Regensburg, Abteilung für Transfusionsmedizin, nach behördlich genehmigtem Protokoll.

Das erythrozytenarme Leukapherisat wird mit PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt, danach auf Ficoll-Hypaque aufgetragen und zentrifugiert (1140xg, 20min, 20°C, ohne Bremse). Es bilden sich drei Phasen über einem Pellet. Das Pellet besteht aus Erythrozyten und Granulozyten (50-80% der Leukozytenfraktion). In der untersten Phase befindet sich das Ficoll, während der Überstand aus PBS sowie Plasma besteht und reich an Thrombozyten ist. In der Interphase separieren sich die gewünschten mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten, im peripheren Blut nur 20-45% der Leukozyten), welche mit einer Pipette abgenommen und zweimal in PBS gewaschen werden (420xg, 10min, 20°C). Anschließend werden die Zellen gezählt (Kapitel 3.2.2).

3.2.2 Ermittlung der Zellzahl

Zur Ermittlung der Zellzahl in einer Zellsuspension werden die Zellen mit 0,16%igem Trypanblau (Gibco) in PBS verdünnt (Verhältnis 1:10) und in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Trypanblau ermöglicht die Unterscheidung von lebenden und toten Zellen unter dem Mikroskop. Der saure Farbstoff bindet als Anion an Zellproteine und dringt bei toten Zellen durch die fehlende Membranintegrität ins Zytosol ein. Dadurch werden tote Zellen, im Gegensatz zu lebenden Zellen, tiefblau gefärbt. Mit Hilfe eines Mikroskops werden die nicht blauen, vitalen Zellen ausgezählt und die Zellzahl anhand folgender Formel bestimmt:

$$\frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Quadranten}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \text{ (Kammerfaktor)} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}}$$

Zellsuspensionen, welche einen verbleibenden Anteil Erythrozyten aufweisen, werden unter Verwendung von Türks Lösung ausgezählt. Diese Lösung enthält neben Trypanblau auch Essigsäure, welche Erythrozyten präferentiell lysiert.

3.2.3 Magnetische Zellseparation

Für die Anreicherung einzelner Zellpopulationen wird die magnetische Separation/Aufreinigung gewählt. Diese Methode beruht auf der Bindung von Zellen an

antikörperbeschichtete supraparamagnetische Partikel (Microbeads) und der anschließenden Trennung markierter von nichtmarkierten Zellen im magnetischen Feld. Hierfür wird die Zellsuspension über eine Säule gegeben, die sich in einem magnetischen Feld befindet. Das Eluat dieser Säule enthält die nichtmarkierten Zellen. Eluiert man die Säule anschließend außerhalb des Magnetfeldes, erhält man die magnetisch markierten Zellen. Die Methode kann sowohl zur positiven Anreicherung einer gewünschten Population (Positivselektion), als auch zur Depletion unerwünschter Populationen (Negativselektion) eingesetzt werden. Hier wird das Midi-MACS System der Firma Miltenyi Biotec GmbH verwendet und die Anreicherung gemäß den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

Zur Anreicherung der CD4⁺ Zellen werden die PBMC nach Ficollseparation (Kapitel 3.2.1) gewaschen und in sterilem MACS-Puffer (80µl pro 10⁷ Zellen) aufgenommen. Nun werden anti-CD4 Microbeads (20µl pro 10⁷ Zellen) hinzugefügt und die Suspension anschließend für 15min bei 4°C inkubiert damit eine Bindung der Antikörperbeads an die CD4-Moleküle stattfindet. Danach wird die Zellsuspension mit MACS-Puffer aufgefüllt und über einen 70µm Zellsieb filtriert. Als Nächstes wird die Suspension abzentrifugiert (310xg, 10min, 4°C) und das Pellet in MACS-Puffer resuspendiert (max. 1x10⁸ Zellen/500µl MACS Puffer). Im Folgenden wird eine LS-Säule (Separationssäule) verwendet, die vorab mit 3ml MACS-Puffer äquilibriert wurde. Die Zellsuspension wird auf die Säule gegeben und diese anschließend dreimal mit je 3ml MACS-Puffer gespült. Zellen, die mit Antikörper-gekoppelten Beads beladen sind, werden von dem Magneten in der Säule zurückgehalten, während die übrigen CD4⁺ Zellen die Säule ungehindert passieren. Die Säule wird anschließend aus dem Magnetfeld entfernt und die gebundenen CD4⁺ Zellen mit 5ml MACS-Puffer eluiert und zur weiteren Verwendung aufgefangen. Durch die Verwendung der entsprechenden Microbeads ist auch die Aufreinigung anderer Zellpopulationen nach gleichem Vorgehen möglich.

3.2.4 Isolierung, Kultivierung sowie phänotypische und funktionelle Charakterisierung regulatorischer T-Zellen

Alle für die Treg-Zellkultur verwendeten humanen Zellen stammen aus Leukapherisaten von gesunden, freiwilligen Spendern und wurden mir freundlicherweise von Rüdiger Eder und Jasmin Stahl (AG Edinger/Hoffmann) zur Verfügung gestellt.

Für die Isolation der Treg Subpopulationen werden die PBMC zunächst unter Verwendung von PE-markierten anti-CD25 Antikörpern (5µl anti-CD25-PE/10⁷ Zellen/100µl FACS-Puffer, 20min Inkubation bei 4°C) und anti-PE Microbeads mit Hilfe des Midi-MACS Systems angereichert (Kapitel 3.2.3). Die CD25 angereicherten Zellen werden anschließend mittels anti-human Antikörper gegen CD4 und CD45RA (10µl anti-CD4-FITC/1,5µl anti-CD45RA-Allophycocyanin/4x10⁶ Zellen/100µl FACS-Puffer, 20min Inkubation bei 4°C) gefärbt (Kapitel

3.2.5.1). Die gefärbten Zellen werden in FACS-Puffer gewaschen, über einen 30µm Zellfilter filtriert und in FACS-Puffer resuspendiert ($1-2 \times 10^7$ Zellen/ml FACS-Puffer). Bei der Sortierung lebender Zellen werden die Zellen mit dem Vitalitätsfarbstoff Propidiumiodid gefärbt um einen Ausschluss toter Zellen zu ermöglichen. Bei intrazellulär gefärbten Proben entfällt dieser Schritt. Mithilfe bestimmter *Sortgates* werden die Zellen, je nach Expression der entsprechenden durchflusszytometrisch gemessenen Marker, in entsprechend angebrachte Ausgabegefäße sortiert. Anhand der Lichtstreuung und -beugung können dabei ebenfalls die physikalischen Eigenschaften Zellgröße (Vorwärts-Streulicht entlang der Achse des einfallenden Lichtes, FCS) und Granularität (Seitwärts-Streulicht, 90° Winkel zum einfallenden Licht, SSC) erfasst werden. Für die Zellkulturen werden die naiven $CD45RA^+$ und die antigenerfahrenen *memory* $CD45RA^-$ Subpopulationen der $CD4^+CD25^{high}$ T-Zellpopulation voneinander separiert. Die fluoreszente Zellsortierung erfolgt am FACS Aria Zellsorter und stellt eine Spezialanwendung der Durchflusszytometrie dar. Reanalysen am FACS Calibur/LSRII bestätigten eine >95%ige Reinheit bezüglich der FOXP3-Expression der sortierten Populationen.

Die *in vitro* Expansion erfolgt unter polyklonaler Stimulation der T-Zellen über ihren TCR und das kostimulatorische Molekül CD28. Dazu werden die T-Zellen auf bestrahlten (70Gy) Mausfibroblasten (L929 Zellen) ausgesät, die nach Transfektion den humanen FCγ-Rezeptor II (CD32) exprimieren. Dies ermöglicht eine flexible Präsentation von anti-human-CD3- (Hamster) und anti-human-CD28- (Maus) Antikörpern und damit eine äußerst effektive Stimulation der Zellen. Zusätzlich erhalten die T-Zellen IL-2 in hoher Dosis (300U/ml), da sie auf dieses Zytokin angewiesen sind, es aber nicht selbst produzieren können (Kapitel 1.3).

Die Zellen werden für insgesamt 11 Tage *in vitro* expandiert. Ein bis zwei Tage vor dem Ansetzen einer neuen Treg Zellkultur werden $1,5 \times 10^5$ bestrahlte $CD32^+$ L-Zellen/ml cRPMI in 96-well-Flachbodenplatten (100µl/Vertiefung) ausgesät und bei 5% CO_2 , 95% Luftfeuchtigkeit sowie 37°C im Inkubator kultiviert. Am Tag des Sorts wird das Medium aus den L-Zell besetzten Flachbodenplatten abgenommen und $1-2 \times 10^4$ gesortete Treg, zusammen mit IL-2, anti-CD3 Antikörpern (OKT3) und anti-CD28 Antikörpern (CD28.2), in einem Endvolumen von 200µl pro Vertiefung mit cRPMI-Medium ausplattiert (Endkonzentrationen: 300U/ml IL-2, 100ng/ml OKT-3, 100ng/ml CD28). Die Zellen werden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert, an Tag 4 wird jeweils 100µl des Mediums durch 100µl frisches cRPMI (versetzt mit 300U/ml IL-2) ersetzt. An Tag 6 werden die Kulturzellen auf mit L-Zellen bestückte 24-well- bzw. 6-well-Platten umgesetzt (1 bzw. 5×10^5 Zellen/Vertiefung). Die bestrahlten L-Zellen werden hierzu vorher, wie bereits oben beschrieben, mit den gleichen Konzentrationen an IL-2, anti-CD3 und anti-CD28 ausplattiert (Endmengen von 500µl bzw. 3ml pro Vertiefung). Die Treg Zellen werden aus den 96-well-Flachbodenplatten geerntet, alle Zellen einer Kultur gemeinsam in cRPMI gewaschen und neu angesetzt.

An Tag 6 und Tag 11 wird die Zellzahl der Kultur erhoben und aus einem kleinen, jeweils repräsentativen Teil der Kulturzellen eine durchflusszytometrische Analyse des Phänotyps (CCR7, CD4, CD25, CD62L, FOXP3) durchgeführt.

Die Stimulation der Zellen mittels CD3/CD28 kann zu kurzfristigen Veränderungen des Immunphänotyps der behandelten, *in vitro* expandierten Kulturzellen führen. Um die transiente, aktivierungsassoziierte Hochregulation von FOXP3 in Nicht-Treg Zellen von der konstitutiv hohen FOXP3-Expression auf nTreg unterscheiden zu können, werden die Zellen vor den Analysen ruhig gestellt. Hierzu werden die *in vitro* expandierten Treg für 2 bis 4 Tage in einem Medium, bestehend aus cRPMI mit 300U/ml IL-2, inkubiert. In 24-well-Zellkulturplatten können auf diese Weise 1×10^6 Zellen/Vertiefung in 1ml Medium ruhiggestellt werden, in 6-well Zellkulturplatten 5×10^6 Zellen in 5ml Medium.

Zur Analyse des Zytokinexpressionsprofils bedarf es der Restimulation der Zellen. Dazu werden jeweils 1×10^6 Zellen in 1ml cRPMI Medium mit 20ng/ml Ionomycin, 1µM PMA und 0,66µl/ml GolgiStop für 5h bei 37°C und 5%iger CO₂ Konzentration stimuliert.

3.2.5 Zellfärbung mit Antikörpern für durchflusszytometrische Analysen

3.2.5.1 Oberflächenfärbung

Pro Ansatz werden 1×10^6 Zellen verwendet. Die Zellen werden mit FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert (300xg, 5min, 4°C) und der Überstand abgesaugt. Nach dem Resuspendieren des Zellpellets in 100µl FACS-Puffer werden die gewählten Oberflächenantikörper zur Zellsuspension pipettiert. An dieser Stelle werden alle gewünschten Antikörper, die sich gegen die zu untersuchenden Oberflächenantigene richten, zugegeben. Nach vorsichtigem Schwenken der Suspension erfolgt die Inkubation für 20min bei 4°C. Nun wird das Zellpellet noch einmal mit FACS-Puffer gewaschen um nicht gebundene Antikörper aus der Suspension zu entfernen. Anschließend werden die Zellen in 250µl FACS-Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert. Um zwischen toten und lebenden Zellen unterscheiden zu können, wird kurz vor dem Messvorgang entweder der Vitalitätsfarbstoff DAPI (10µl Gebrauchslösung (10µg/ml)/100µl Zellsuspension) oder PI (10µl Gebrauchslösung (25µg/ml)/100µl Zellsuspension) hinzugegeben. Diese gelangen bei nicht intakter Zellmembran ins Zellinnere und binden an die DNA. DAPI lagert sich dabei an A/T-reiche Regionen der kleinen Furche der DNA an während PI mit der Doppelhelix interkaliert und bei Exzitation mit blauem Licht (488nm) rotes Licht emittiert. Durch die Färbung der toten Zellen wird eine Diskriminierung von lebenden Zellen mit intakter Zellmembran möglich. Zur Aufnahme der Zellen wird am LSRII die BD FACS DIVA und am FACS Calibur

die CellQuest Pro Software verwendet, das Analyseprogramm FlowJo Software wird zur Auswertung herangezogen.

3.2.5.2 Intranukleäre Färbung von Transkriptionsfaktoren mit einem kommerziell erhältlichen Färbekit

Die Färbung von FOXP3 und auch anderen Transkriptionsfaktoren erfolgt mit den Reagenzien und gemäß dem Protokoll der Firma eBioscience. Bei vorangehender Oberflächenfärbung (Kapitel 3.2.5.1) werden die Zellen nach dem letzten Waschschrift vorsichtig resuspendiert. Danach erfolgt die Zugabe von 1ml Fixierungs-/Permeabilisierungslösung auf dem Vortexer, wodurch die Zellen gleichzeitig fixiert und permeabilisiert werden (30min, 4°C). Alle weiteren Schritte erfolgen in Permeabilisierungspuffer. Nach zweimaligem Waschen wird das Pellet in 100µl Puffer resuspendiert und zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen des anti-FOXP3 Antikörpers mit 2µl Rattenserum versetzt. Nach Inkubation für 15min bei 4°C erfolgt direkt die Zugabe der für die intrazelluläre Färbung vorgesehenen Antikörper (gegen Transkriptionsfaktoren und gegebenenfalls auch gegen Zytokine). Nach weiteren 30min Inkubation bei 4°C werden die Zellen zweimal gewaschen, beim zweiten Mal unter Verwendung von FACS-Puffer. Zum Schluss werden die Zellen für den Messvorgang in 250µl FACS-Puffer resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

3.2.6 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgt entweder mit dem RNeasy Micro Kit nach dem Protokoll der Firma Qiagen oder mittels TRIzol mit den Reagenzien und gemäß dem Protokoll der Firma Invitrogen. Um das Material gegenüber der Einwirkung von endogenen und exogenen Ribonukleasen (RNasen) zu schützen, werden für die RNA-Extraktion ausschließlich RNase-freie Filterspitzen und Plastikwaren verwendet. Die Proben werden auf Eis gelagert (soweit nicht anders vorgegeben) sowie alle Lösungen, wenn möglich, zur Inaktivierung vorhandener RNasen mit 0,1%igem Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt und anschließend autoklaviert. Im Folgenden wird beispielhaft die RNA Extraktion mittels TRIzol näher beschrieben. Die Herstellerprotokolle sind auf den jeweiligen Firmenseiten einzusehen.

Zur RNA-Extraktion mittels TRIzol werden abzentrifugierte Zellen durch Zugabe von 1ml TRIzol (pro $5\text{-}10 \times 10^6$ Zellen) lysiert und anschließend in ein Eppendorf Cup überführt. Zur weiteren Verarbeitung von 1ml Zelllysate werden 0,2ml Chloroform vorsichtig hinzugefügt und alles unter kräftigem Schütteln gut vermengt. Nach 2-3min ruhigem Stehen bei Raumtemperatur wird die Suspension bei $12000 \times g$ und 2-8°C für 15min zentrifugiert. Die obere farblose Phase wird in ein frisches Eppendorf Cup überführt und mit einer Pipette 20µl

Glykogenlösung zugegeben. Die RNA wird nun mit 0,5ml Isopropylalkohol präzipitiert. Nach einer weiteren Ruhephase von 10min bei Raumtemperatur wird die Suspension noch einmal für 10min unter oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet mit 1ml 75%igem Ethanol gewaschen (max. 7500xg, 5min, 2-8°C). Nach dem Abnehmen des Überstandes lässt man das Pellet bei Raumtemperatur leicht, aber nicht vollständig trocknen, bevor es mit der Pipette vorsichtig in 15µl DEPC-H₂O gelöst wird. Die Proben werden anschließend mit dem Agilent 2100 Bioanalyser unter Verwendung des RNA 6000 Nano Lab Chip® Kits (Agilent Technologies) gemäß den Vorgaben des Herstellers bezüglich RNA-Integrität, Reinheit und Konzentration analysiert. Alternativ wird die RNA Konzentration mit dem Nanodrop 1000 Spektrophotometer und die RNA Integrität mittels Gelelektrophorese bestimmt.

3.2.7 RNA-Quantifizierung mit Hilfe des Nanodrop-Spektrophotometers

Um die RNA-Konzentration nach RNA-Extraktion zu bestimmen, wird der Nanodrop 1000 im RNA-Messmodus verwendet. Nach Eichung des Gerätes mit RNase-freiem Wasser werden 1,8µl Probenvolumen auf den Detektor aufgetragen und der Messarm geschlossen. Für die anschließende Spektralmessung ist es wichtig, dass die Probe luftfrei aufgetragen wird, um eine Kontinuität des Lichtstrahls zu gewährleisten. Das Gerät misst anschließend die Probenabsorption in einem Bereich von 220nm-750nm und berechnet daraus die RNA-Konzentration in der Probe. Zusätzlich werden Absorptionsratios bestimmt, welche dem Benutzer anschließend Informationen über die Qualität der Probe geben. Die 260/280-Ratio sollte bei ca. 2.0 liegen und ist ein Maß für die Reinheit der RNA. Ist die Ratio beträchtlich kleiner gibt dies einen Hinweis auf das Vorhandensein von Kontaminationen in der Probe welche bei 280nm Licht stark absorbieren (z.B. Proteine und Phenol). Die zweite Messung der Nukleinsäurereinheit erfolgt durch die Bestimmung der 260/230-Ratio. Bei Werten zwischen 1,8 und 2,2 ist von einem hohen Reinheitsgrad der Probe auszugehen. Liegt das Messergebnis weit unter diesem Wert, ist von einer Verunreinigung der Probe auszugehen.

3.2.8 Überprüfung der RNA-Qualität mittels Bioanalyser oder RNA-Gelelektrophorese

Zur Entwicklung eines neuen intranukleären Färbeprotokolls für die Durchflusszytometrie, welches eine anschließende Extraktion intakter RNA ermöglicht, werden zur Qualitätsbeurteilung der RNA der Agilent Bioanalyser und ethidiumbromidgefärbte Agarosegele verwendet.

Für die Herstellung eines Gels mit 50ml Gelvolumen werden 0,5g Agarose abgewogen und mit 38ml DEPC-H₂O sowie 2,5ml 20-fachem MOPS in einen Erlenmeyerkolben gegeben.

Unter visueller Kontrolle erfolgt das Erhitzen in einer Mikrowelle bis zum Erhalt einer klaren Flüssigkeit. Auf einem Magnetrührer lässt man die Flüssigkeit unter kontinuierlichem Rühren auf 60°C abkühlen und gibt unter dem Abzug 8,8ml 37%iges Formaldehyd zu. Bei einer Temperatur unter 50°C kann das Gel in die Kammer gegossen werden. Dieses lässt man unter dem Abzug bei Raumtemperatur vollständig erkalten, bevor es in die Elektrophoresekammer gelegt wird. Nach Entfernung der Kämme und Begrenzungen wird die Gelkammer bis zur kompletten Bedeckung des Gels mit 1x MOPS (ca. 400ml) aufgefüllt. Die zu testenden RNA-Proben werden nun in 0,5ml Eppendorf Cups für 30min auf 37°C erwärmt (500ng RNA/Mindestvolumen 2µl). Anschließend werden 4µl *loading dye*/µl RNA hinzugegeben und die Proben für weitere 20min bei 65°C inkubiert. Dann können die Proben vorsichtig in die Taschen pipettiert werden (10-30µl/Tasche). Nach 45-60min bei 76 Volt wird das Gel zum Fotografieren unter UV-Licht gelegt oder mit dem Typhoon Scanner gescannt. Als Referenz dient die RNA aus unfixierten Zellen, als Qualitätsmerkmal bei der RNA-Gelelektrophorese werden die 28S und 18S ribosomalen RNA Banden begutachtet. Bei degradierter ribosomaler RNA ist davon auszugehen, dass auch die übrigen mRNAs der Zellen in ähnlicher Weise betroffen sind. Entsprechend ist anzunehmen, dass bei intakter ribosomaler RNA auch die mRNAs der Zellen überwiegend intakt sind.

Der Bioanalyzer wird verwendet, da er im Gegensatz zum herkömmlichen Gel durch die standardisierte Berechnung einer *RNA Integrity Number* (RIN) die Möglichkeit der Objektivierung der RNA-Qualität gibt. So bietet er die Möglichkeit, verschiedene Proben besser untereinander vergleichen zu können. Ferner ist die Analyse am Bioanalyzer mit wesentlich geringeren RNA Mengen möglich als denen, die man zur Auftragung auf ein konventionelles Gel benötigt. Die Verwendung von Gelen und des Bioanalyzers zur Qualitätskontrolle der RNA ist essentiell, da RNA-Degradation rein spektrophotometrisch (am Nanodrop) nicht erfasst werden kann. Zudem ermöglicht der Bioanalyzer auch die Qualitätskontrolle der RNA direkt vor dem Auftragen auf die Microarrays ohne eine wesentliche Reduzierung der Probenmenge für die Arrays. Alle Bioanalyzernetzen entstanden im Rahmen der Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Rehli (Universitätsklinikum Regensburg, Innere Medizin III) und wurden mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.2.9 Microarrays

Das Labeling und die Hybridisierung wurden mit Hilfe des *Agilent Gene Expression Systems* entsprechend den Herstellerangaben (Agilent Technologies) durchgeführt. Die RNA Microarrays entstanden in Zusammenarbeit mit Christian Schmidl und Lucia Schwarzfischer in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Rehli (Universitätsklinikum Regensburg, Innere Medizin III), die Daten sind in der Datenbank des National Center for Biotechnology

einzusehen (accession number GSE26190, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE26190>).

3.2.10 Statistik

Zur statistischen Analyse wurden die Programme SPSS, R und VassarStats herangezogen. Es wurde der ungepaarte 2-seitige T-Test und bei $n > 2$ Vergleichsgruppen, soweit nicht anders vermerkt, der *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA)-Test mit dem Tukey HSD Post-hoc Test verwendet. Das Signifikanzniveau α wurde mit 0,05 festgelegt, entsprechende Irrtumswahrscheinlichkeiten p sind jeweils in Klammern angegeben. Die Populationsgrößen sind im Text in Klammern an den entsprechenden Stellen in folgender Form angegeben: (MW \pm SD, $n=x$ Spender). Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mit Microsoft Excel 2007 berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Validierung der Antikörper gegen die Transkriptionsfaktoren FOXP3, T-bet, GATA3 und ROR γ (t) für die FACS-Färbung in Zellen des peripheren Blutes

Ursprünglich wurden die einzelnen CD4⁺ T-Helferzellpopulationen (Th1, Th2, Th17 etc.) anhand ihrer Zytokinexpressionsmuster definiert, in den letzten Jahren geschah dies jedoch zunehmend auch über die Expression linienspezifischer Transkriptionsfaktoren. So sind Th1 Zellen durch die Expression des Transkriptionsfaktors T-bet und die Produktion des Zytokins IFN γ charakterisiert, während Th2 Zellen den Transkriptionsfaktor GATA3 exprimieren und die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 sezernieren. Th17 Zellen produzieren vor allem IL-17A und F bei gleichzeitiger Expression des Transkriptionsfaktors ROR γ (t). Treg sind im Gegensatz zu diesen T-Helferzellpopulationen nicht durch die Produktion linienspezifischer Zytokine, sondern vor allem durch die konstitutive Expression des Oberflächenmarkers CD25 (IL-2R α) sowie des Transkriptionsfaktors FOXP3 definiert.

Im Folgenden sollte die Expression von FOXP3, T-bet, GATA3 und ROR γ (t) zunächst in verschiedenen Zellkompartimenten des peripheren Blutes mittels Durchflusszytometrie untersucht werden. Intranukleäre Transkriptionsfaktorfärbungen mit valider Aussagekraft über die T-Helferzelldifferenzierung sollten anschließend die Möglichkeiten zur durchflusszytometrischen Immunophänotypisierung *in vitro* expandierter regulatorischer Treg erweitern.

4.1.1 Transkriptionsfaktorexpression in unstimulierten PBMC

Die Färbungen erfolgten an frisch isolierten PBMC. Die Gatingstrategie für Lymphozyten ist in Abbildung 4A dargestellt und umfasst neben einem initialen FSC/SSC Gate auch ein FSC-A/FSC-W Gate zum Ausschluss von Dubletten (Abbildung 4A).

Erwartungsgemäß fanden sich FOXP3⁺ Zellen ausschließlich unter den CD4⁺ Zellen. Diese zeigten gleichzeitig eine sehr hohe Expression von CD25 (Abbildung 4B). Somit handelt es sich bei diesen Zellen fast ausschließlich um CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg.

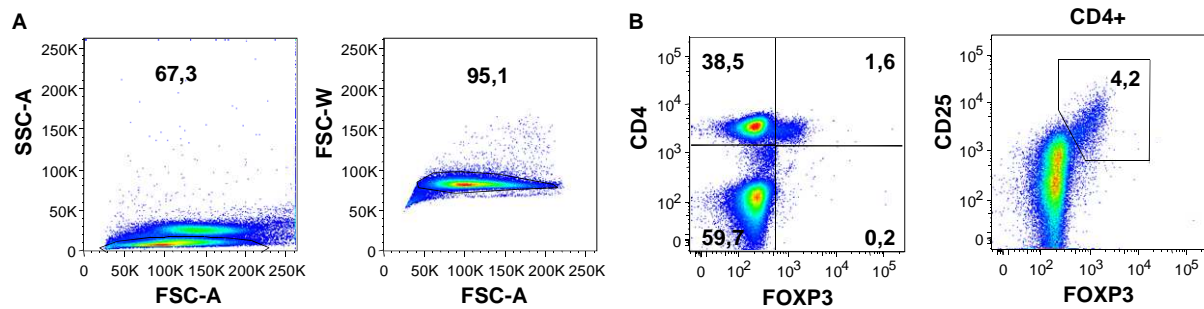


Abbildung 4: FOXP3-Expression in Abhängigkeit von CD25 unter CD4⁺ T-Zellen

Abgebildet sind unstimulierte PBMC. (A) zeigt die Gatingstrategie für Lymphozyten und den Ausschluss von Dubletten, welcher in allen folgenden Analysen an PBMC in gleicher Weise durchgeführt wurde. (B) FOXP3-Expression in Abhängigkeit von CD25. Links sind in (B) alle Lymphozyten und rechts in (B) CD4⁺ Lymphozyten abgebildet. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel aus $n=8$ Spendern.

Nach Färbung mit den Antikörpern gegen T-bet, GATA3 und ROR γ (t) ließen sich in unstimulierten PBMC unter den CD4⁺ T-Zellen keine für diese Transkriptionsfaktoren eindeutig positiven Populationen abgrenzen (nachfolgend in den Abbildung 5A, Abbildung 6A und Abbildung 7). Zur genaueren Beurteilung der verwendeten Antikörper bzw. zur Überprüfung, ob diese überhaupt und wenn ja an welche Lymphozytenpopulationen des peripheren Blutes spezifisch binden, wurden daraufhin ebenfalls CD4⁻ Lymphozyten betrachtet. Dabei fiel auf, dass CD4⁻ Zellen T-bet bzw. GATA3 exprimierende Populationen beinhalteten (Abbildung 5 und Abbildung 6).

Zur weiteren Charakterisierung dieser Zellpopulationen wurde zuerst die intranukleäre T-bet Färbung mit CD8 sowie mit Oberflächenmarkern für NK-Zellen (CD56), NKT-Zellen (CD56 und CD3) und B-Zellen (CD19) kombiniert (Abbildung 5).

In konventionellen CD8⁺ T-Zellen (CD8⁺CD56⁻) zeigte sich eine Population T-bet⁺ Zellen, welche jedoch in ihrer Größe spenderabhängig variierte (31,0%±16,9%, $n=5$ Spender, Abbildung 5A). Dies ist mit der Tatsache vereinbar, dass T-bet ein wichtiger Transkriptionsfaktor in der antigenabhängigen Differenzierung von naiven CD8⁺ T-Zellen hin zu reifen zytotoxischen CD8⁺ *memory* T-Zellen ist [149].

Bei den B-Zellen fiel ebenfalls eine kleine T-bet⁺ Population auf (2,5%±1,0%, $n=5$ Spender, Abbildung 5A). Dies erklärt sich durch die bekannte Abhängigkeit des Ig-Klassenwechsels naiver IgM⁺ B-Zellen hin zu IgG2a-produzierenden B-Zellen von einer erhöhten Expression dieses Transkriptionsfaktors [150].

Im Gegensatz zu den beiden vorherigen Populationen waren NK-Zellen (CD56⁺CD3⁻) fast ausschließlich T-bet⁺ (Abbildung 5B). Bekannt ist, dass NK-Zellen für die Differenzierung T-bet benötigen. So konnten Gordon et al. zeigen, dass T-bet *knock-out* Mäuse keine NK-Zellen entwickeln können [151]. Zudem weiß man, dass IL-17⁺IFN γ ⁺ NK17/NK1 Zellen den Transkriptionsfaktor T-bet besonders ausgeprägt exprimieren [152]. Diese Subpopulation der NK-Zellen spielt eine Rolle bei Th1-vermittelten Immunantworten. Die erzielten Ergebnisse

legten zudem nahe, dass in NK-Zellen ein generell höheres Expressionsniveau von T-bet vorliegt als in anderen Populationen des peripheren Blutes. Eine kleine Gruppe NK-Zellen zeigte sich T-bet⁺, welche allerdings in dieser Arbeit nicht weiter charakterisiert wurde (Abbildung 5B).

Unter den NKT-Zellen (CD56⁺CD3⁺) fand sich eine deutlich ausgeprägte T-bet⁺ Population (Abbildung 5B), die nahezu ausschließlich aus CD8⁺CD56⁺ NKT-Zellen bestand (T-bet⁺ in CD8⁺CD56⁺: 54,7%±23,3%, n=5 Spender, Abbildung 5A). Die T-bet⁺ Population unter den CD56⁺CD3⁺ Zellen sind möglicherweise durch eine virusinduzierte Hochregulation von CD56 und T-bet auf CD8⁺ Zellen zu erklären.

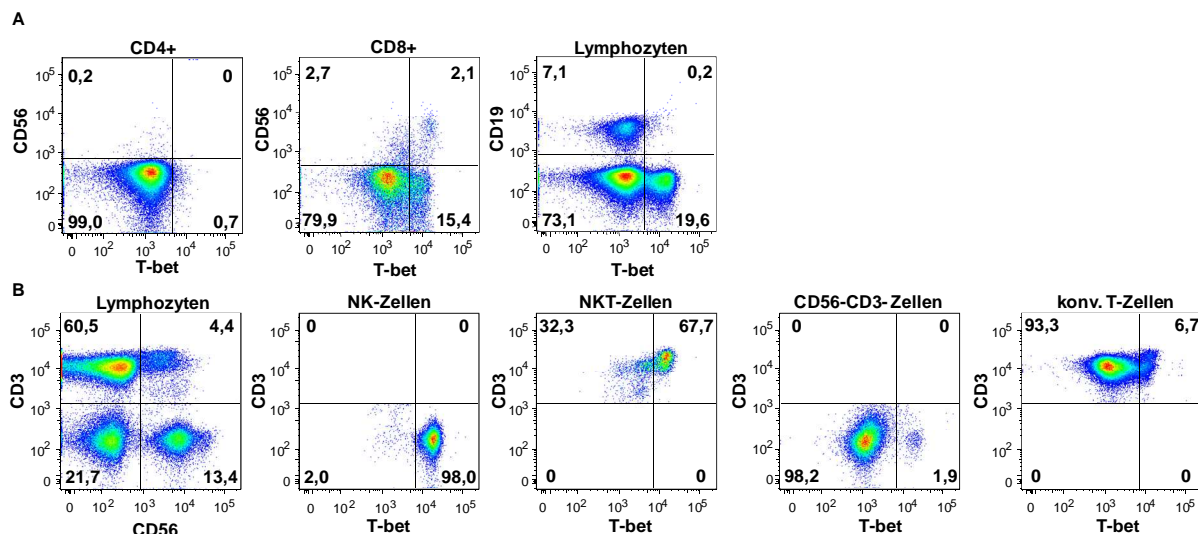


Abbildung 5: T-bet Expression in humanen PBMC Subpopulationen

Unstimulierte PBMC wurden mit Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenmarker und anschließend intranukleär mit einem T-bet spezifischen Antikörper gefärbt. Die Dotplots zeigen Lymphozyten bzw. die über den Dotplots angegebenen Populationen. (A) zeigt die Expression von T-bet selektiv in CD4⁺ und CD8⁺ Zellen sowie in B-Zellen. (B) Identifikation von NK-Zellen (CD56⁺CD3⁻), NKT-Zellen (CD56⁺CD3⁺), konventionellen T-Zellen (CD56⁻CD3⁺) und deren T-bet Expression. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel.

Als nächstes wurde die GATA3 Expression in den verschiedenen PBMC Subpopulationen näher untersucht. Obwohl konventionelle T-Zellen (CD56⁻CD3⁺) GATA3 homogen höher exprimierten als andere Lymphozytenpopulationen (NKT-, CD56⁻CD3⁻ oder B-Zellen), ließ sich keine eindeutig GATA3⁺ Population vom Rest der Zellen abgrenzen (Abbildung 6). So fand sich auch, wie oben bereits erwähnt, unter CD4⁺ konventionellen T-Zellen nur eine inkonstante, unscharf abgrenzbare Population GATA3⁺ Zellen (5,0%±3,4%, n=11 Spender, Abbildung 6A).

CD19⁺ B-Zellen exprimierten (dagegen) erwartungsgemäß kein GATA3 (Abbildung 6A).

Interessanterweise fand sich jedoch unter den CD56⁺ Zellen eine GATA3 exprimierende Subpopulation (7,8%±4,2%, n=6 Spender), die außerdem durch eine besonders hohe Expression von CD56 gekennzeichnet war. Auch in Abbildung 6B zeigt sich unter den NK-Zellen diese Subpopulation (GATA3⁺CD56^{high} NK-Zellen). GATA3 spielt, wie T-bet, in einigen

Reifungsstadien der NK-Zellen eine wichtige Rolle und konnte zumindest auf RNA-Ebene in diesen bereits nachgewiesen werden [153]. Die hier erhaltenen Färbeergebnisse bestätigten dies.

NKT-Zellen zeigten hingegen ein überwiegend intermediäres Expressionslevel für GATA3 (Abbildung 6B).

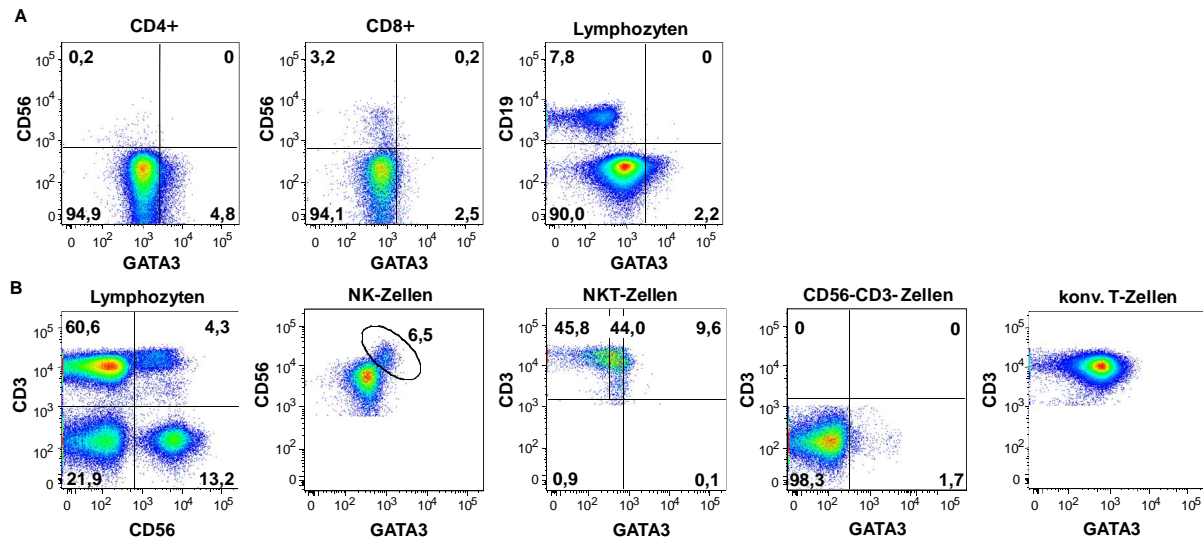


Abbildung 6: GATA3 Expression in humanen PBMC Subpopulationen

Unstimulierte PBMC wurden mit Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenmarker und anschließend intranukleär mit einem GATA3 spezifischen Antikörper gefärbt. Die Dotplots zeigen Lymphozyten bzw. die über den Dotplots angegebenen Populationen. (A) zeigt die Expression von GATA3 selektiv in CD4⁺ und CD8⁺ Zellen sowie in B-Zellen. (B) Identifikation von NK-Zellen (CD56⁺CD3⁻), NKT-Zellen (CD56⁺CD3⁺), konventionellen T-Zellen (CD56⁻CD3⁺) und deren GATA3 Expression. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel.

Für RORγ(t) zeigten sich mit dem hier verwendeten Antikörper der Firma eBioscience unter keiner der analysierten PBMC Subpopulationen eindeutig positive Zellen. Die gering höhere Expression von RORγ(t) in einigen wenigen Zellen ließ sich nur unscharf vom homogenen Großteil der Zellen abgrenzen (Abbildung 7) und war in den einzelnen Experimenten inkonsistent. Auch der Unterschied zwischen CD19⁺ und CD19⁻ Zellen zeigte sich statistisch nicht signifikant (MFI RORγ(t) in CD19⁻ Zellen (824,3±271,0) vs. CD19⁺ Zellen (710,5±284,8) p=0,53/ungepaarter 2-seitiger T-Test, n=6 Spender).

Inzwischen ist für RORγ(t) auch ein weiterer Antikörper (BD, Klon Q21-559) kommerziell erhältlich, auch dieser erzielte jedoch keine wesentlich unterschiedlichen Färbeergebnisse (Daten nicht abgebildet).

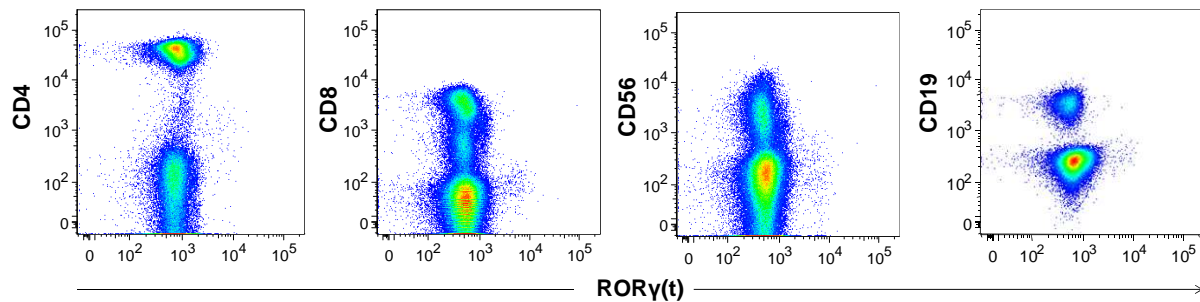


Abbildung 7: ROR γ (t)-Expression in humanen PBMC Subpopulationen

Unstimulierte PBMC wurden mit Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenmarker und anschließend intranukleär mit einem Antikörper gegen ROR γ (t) gefärbt. Die Dotplots zeigen ausschließlich Lymphozyten. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel aus $n=10$ (CD4), $n=4$ (CD8), $n=5$ (CD56) und $n=6$ (CD19) unabhängigen Experimenten von jeweils verschiedenen Spendern.

4.1.2 Transkriptionsfaktorexpression in stimulierten PBMC

In unstimulierten PBMC ließen sich eindeutig TF-positive Populationen nur für FOXP3 (CD4⁺ regulatorische T-Zellen) und T-bet (in CD4⁻ Lymphozyten) abgrenzen. Im Gegensatz zu den bisherigen Messungen, in denen die Transkriptionsfaktorexpression in PBMC direkt nach deren Isolierung untersucht wurde, sollte diese im Folgenden nach *in vitro* Stimulation der Zellen für 5h mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Ionomycin in Gegenwart von Monensin (GolgiStop) analysiert werden. Diese Art der Stimulation stellt eine TCR-antigenunabhängige Stimulation von T-Zellen dar. PMA aktiviert dabei die Proteinkinase C, während Ionomycin zum Anstieg des Kalziumspiegels in der Zelle führt. Die Zugabe von Monensin hemmt dazu den Proteintransport aus der Zelle und somit auch die Sekretion der während der Stimulation gebildeten Zytokine. Diese Zytokine liegen somit verstärkt intrazellulär vor, wodurch im Anschluss an die Stimulation die Ermittlung des Zytokinexpressionspotentials einzelner Zellen, zusammen mit der Expression der verschiedenen Transkriptionsfaktoren, ermöglicht wird.

Auch nach PMA/Ionomycin Stimulation ließ sich unter den CD4⁺ Zellen keine eindeutig T-bet⁺ Population abgrenzen und es zeigte sich allenfalls eine homogen höhere T-bet Expression als in unstimulierten CD4⁺ Zellen. Unter den CD4⁻ Zellen zeigte sich, ähnlich wie in unstimulierten CD4⁻ Zellen, weiterhin eine deutliche Auftrennung in eine T-bet⁺ und eine T-bet⁻ Zellpopulation. Im Gegensatz dazu ließ sich nach Stimulation eine deutliche Population GATA3⁺ Zellen sowohl unter den CD4⁺ T-Zellen (4,4% \pm 2,0%, $n=6$ Spender, Abbildung 8), als auch unter den restlichen Lymphozyten (CD4⁻ Zellen, 1,0% \pm 0,3%, $n=6$ Spender) abgrenzen (Abbildung 8). Für ROR γ (t) zeigten sich auch nach PMA/Ionomycin Stimulation keine eindeutig positiven oder negativen Populationen (Abbildung 8), wohingegen nach FOXP3-Färbung, wie bereits in unstimulierten PBMC, unter den CD4⁺ Zellen wieder deutlich die FOXP3⁺ Treg Zellen zu erkennen waren (Abbildung 8). Es zeigte sich zudem eine kleine Population CD4⁻FOXP3⁺ Zellen (Abbildung 8). Im Rahmen der PMA/Ionomycin Stimulation

kann die Expression von Transkriptionsfaktoren unspezifisch hochreguliert werden. Bei diesen Zellen handelt es sich am wahrscheinlichsten um Zellen, die FOXP3 aufgrund der Stimulation exprimieren.

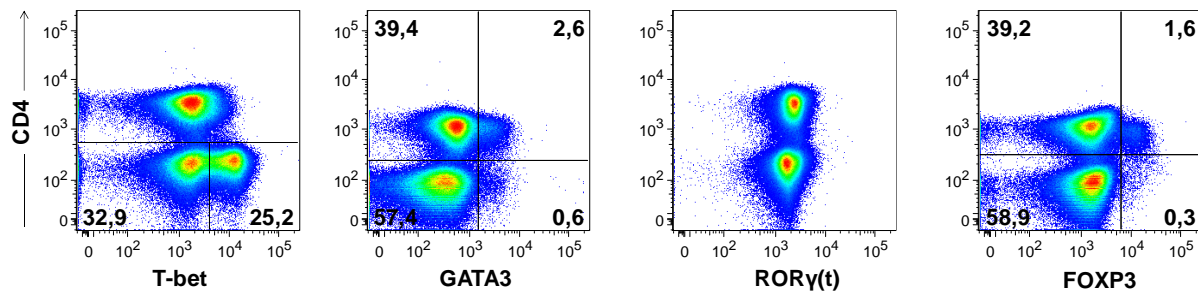


Abbildung 8: T-bet, GATA3, RORγ(t) und FOXP3-Expression in stimulierten PBMC in Abhängigkeit von CD4

PBMC wurden für 5h mit PMA/Ionomycin stimuliert und anschließend mit Antikörpern gegen CD4 und die angegebenen Transkriptionsfaktoren gefärbt. Die Dotplots zeigen Lymphozyten. Zu sehen ist jeweils die Transkriptionsfaktorexpression in Abhängigkeit von der CD4 Expression. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel aus n=6 Spendern.

4.1.3 Simultaner Nachweis intranukleärer Transkriptionsfaktoren und intrazytoplasmatischer Zytokine in T-Helferzellen

Da die Einteilung der CD4⁺ T-Zellen in die T-Helferzellpopulationen Th1, Th2 und Th17 nicht nur aufgrund der Expression liniendefinierender Transkriptionsfaktoren, sondern auch anhand helfertypspezifischer Zytokine erfolgt, wurde im nächsten Schritt untersucht, inwiefern die Produktion dieser zelltypspezifischen Zytokine (IL-4, IL-13, IL-17, IFNγ) mit der Expressionsstärke der entsprechenden Transkriptionsfaktoren korreliert. Hierzu wurden mittels magnetischer Separation angereicherte CD4⁺ PBMC für 5h mit PMA/Ionomycin stimuliert (in Gegenwart von GolgiStop) und anschließend mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich der von ihnen produzierten Zytokine und der exprimierten Transkriptionsfaktoren untersucht.

T-bet gilt als linienspezifischer Transkriptionsfaktor für Th1 Zellen, dementsprechend wurde in IFNγ-Produzenten, verglichen zu IL-13- (Th2) und IL-17-Produzenten (Th17), eine höhere T-bet Expression erwartet. Ein entsprechender Trend war zumindest zwischen IL-13- und IFNγ-Produzenten festzustellen. Allerdings erreichte dieser Unterschied keine statistische Signifikanz (MFI T-bet in IFNγ- vs. IL-13-Produzenten p=0,08/ungepaarter 2-seitiger T-Test, n=4, Abbildung 9B und D) und auch der Unterschied zwischen den drei Gruppen von Zytokinproduzenten war nicht signifikant (Abbildung 9 und Tabelle 16). Eine eindeutige Identifikation von Th1 Zellen allein anhand der FACS-basierten T-bet Expressionsmessung schien somit nicht möglich.

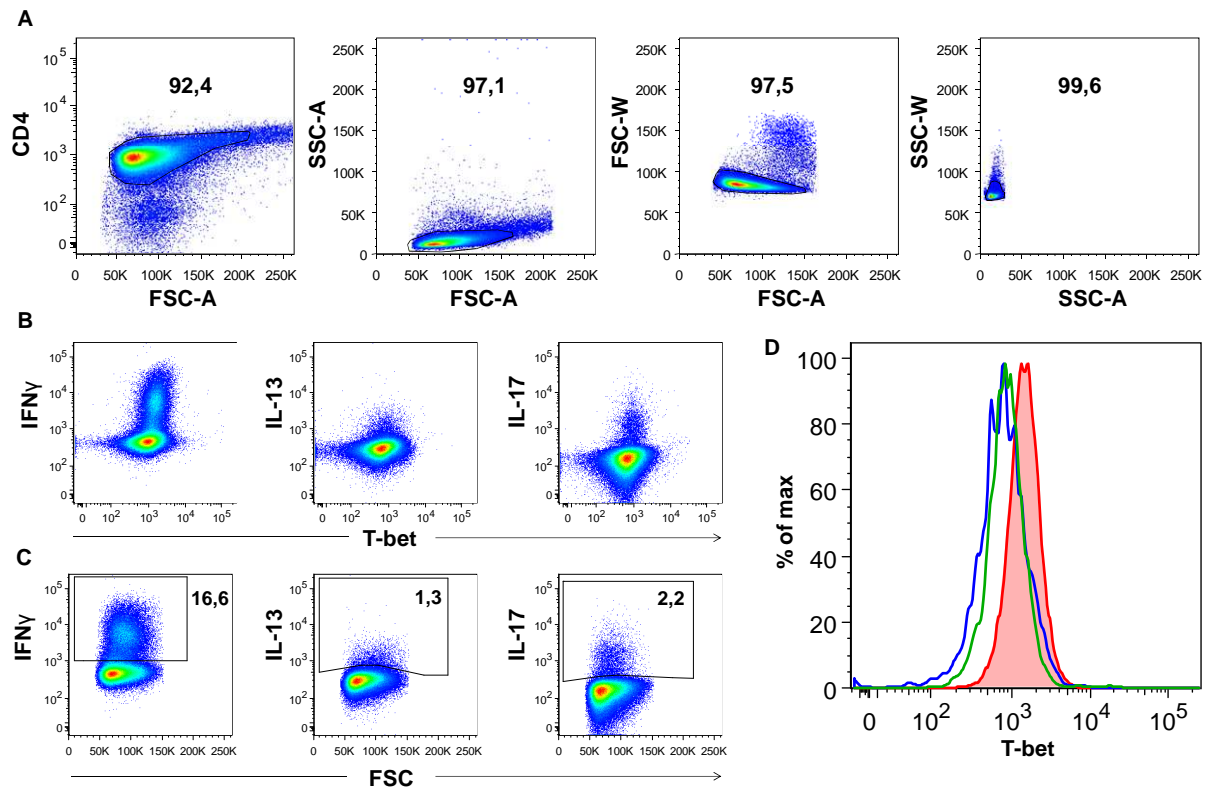


Abbildung 9: T-bet Expression in IFN γ -, IL-13-, bzw. IL-17-produzierenden CD4⁺ T-Zellen

Mittels MACS angereicherte CD4⁺ PBMC wurden für 5h mit PMA/Ionomycin in Gegenwart von GolgiStop stimuliert und anschließend gefärbt. (A) zeigt die Gatingstrategie auf CD4⁺ Lymphozyten und den Ausschluss von Dubletten für diese und alle nachfolgenden Messungen dieses Abschnitts. Die Dotplots zeigen CD4⁺ Lymphozyten. (B) Koexpression von T-bet und IFN γ , IL-13 bzw. IL-17 in stimulierten CD4⁺ T-Zellen. (C) Gating der IFN γ -, IL-13- bzw. IL-17-Produzenten unter CD4⁺ T-Zellen. (D) T-bet Expression in IFN γ -, IL-13- bzw. IL-17-Produzenten aus (C). Die Abbildung ist repräsentativ für n=4 Spender; die Daten aller Messungen sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt.

IFN γ -Produzenten ■, IL-13-Produzenten ■, IL-17-Produzenten ■

Tabelle 16: Populationsgrößen und MFI von T-bet in den untersuchten Zytokinproduzenten

Zytokin	Zytokinproduzenten unter CD4 ⁺	MFI T-bet	Signifikanz vs. IFN γ (MFI)
IFN γ (MW \pm SD), (n=4)	21,2% \pm 2,6%	2598,8 \pm 614,4	—
IL-13 (MW \pm SD), (n=4)	2,6% \pm 0,9%	1624,0 \pm 516,2	p>0,05
IL-17 (MW \pm SD), (n=4)	2,4% \pm 1,1%	2092,0 \pm 722,0	p>0,05

Der MFI Unterschied zwischen den drei Gruppen war statistisch nicht signifikant, p=0,21.

Im Folgenden wurde untersucht, inwieweit die GATA3 Expression unter CD4⁺ Zellen mit dem Expressionsprofil von Th2 Zytokinen korreliert (Abbildung 10). Vergleicht man die MFI Werte der einzelnen Zytokinproduzenten nach Stimulation mit PMA/Ionomycin, so sieht man signifikant höhere Expressionslevel in den IL-13-produzierenden T-Zellen als in den IFN γ - oder IL-17-Produzenten (Abbildung 10).

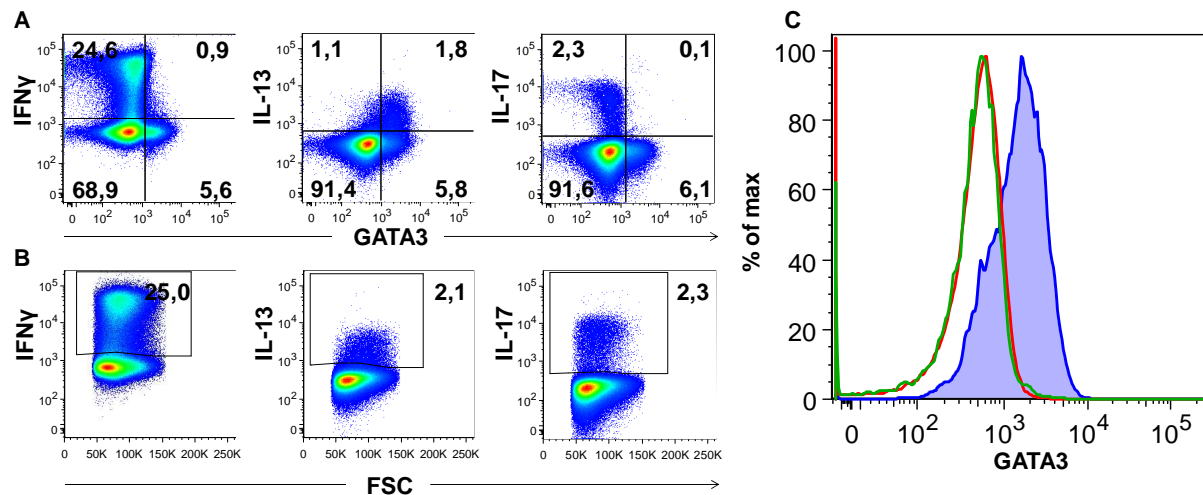


Abbildung 10: GATA3 Expression in IFN γ -, IL-13-, bzw. IL-17-produzierenden CD4⁺ T-Zellen

Mittels MACS angereicherte CD4⁺ PBMC wurden für 5h mit PMA/Ionomycin in Gegenwart von GolgiStop stimuliert und anschließend gefärbt. Die Dotplots zeigen CD4⁺ Lymphozyten. (A) Koexpression von GATA3 und IFN γ , IL-13 bzw. IL-17 in CD4⁺ T-Zellen. (B) Gating der IFN γ -, IL-13- bzw. IL-17-Produzenten unter CD4⁺ T-Zellen. (C) GATA3 Expression in IFN γ -, IL-13- bzw. IL-17-Produzenten aus (B). Die Abbildung ist repräsentativ für n=4 Spender. Die Daten aller Messungen sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt.

IFN γ -Produzenten ■, IL-13-Produzenten ■, IL-17-Produzenten ■

Tabelle 17: Populationsgrößen und MFI von GATA3 in den untersuchten Zytokinproduzenten

Zytokin	%GATA ⁺ Zellen unter Zytokinproduzenten	MFI GATA3	Signifikanz vs. IL-13 (MFI)
IFN γ (MW \pm SD), (n=9)	4,1 \pm 2,8%	792,8 \pm 345,0	p<0,01
IL-4 (MW \pm SD), (n=5)	49,4 \pm 9,1%	2409,2 \pm 1102,1	p>0,05
IL-13 (MW \pm SD), (n=7)	62,6 \pm 10,3%	2285,4 \pm 1048,6	—
IL-17 (MW \pm SD), (n=5)	5,0 \pm 4,3%	920,8 \pm 459,7	p<0,01

Der MFI Unterschied zwischen den Gruppen war statistisch signifikant, p<0,001.

Interessanterweise exprimierten nach Stimulation durchschnittlich 10,0 \pm 4,7% der CD4⁺ T-Zellen aus n=7 Spendern GATA3, wobei sich unter diesen Zellen jedoch nur 17,8 \pm 6,1% (n=7 Spender) IL-13-Produzenten fanden. Das heißt, dass in ca. 80% der GATA3⁺ Zellen zum gemessenen Zeitpunkt kein IL-13 detektierbar war. Andererseits zeigten nur knapp zwei Drittel der IL-13-produzierenden Zellen und etwa die Hälfte der IL-4⁺ Zellen eine deutlich erhöhte GATA3 Expression, wohingegen IFN γ - und IL-17-Produzenten tatsächlich erwartungsgemäß zum Großteil GATA3⁺ waren (Tabelle 17).

Betrachtet man die GATA3 Expressionsstärke in den einzelnen Th2-Zytokinproduzenten, so wurde der Anteil GATA3⁺ Zellen unter den Zellen umso höher, je spezifischer die Population dem Th2 Zytokinexpressionsmuster entsprach (Abbildung 11). Dies zeigte sich insbesondere bei der simultanen Messung zweier Zytokine mit GATA3. So fand sich sowohl der höchste

Anteil an GATA3⁺ Zellen, als auch die höchste MFI für GATA3 erwartungsgemäß unter den IL-4⁺IL-13⁺ Doppelproduzenten (Tabelle 18); der Unterschied zwischen dieser Gruppe und allen weiteren betrachteten Zytokinproduzenten zeigte sich jeweils statistisch signifikant (Tabelle 18).

Dagegen traten zwischen IL-4⁺IL-13⁺ und IL-4⁺IL-13⁻ Zellen weder in Bezug auf die MFI von GATA3, noch auf den Anteil GATA3⁺ Zellen statistisch signifikante Unterschiede auf (n=3 Spender, Tabelle 18).

Interessanterweise exprimieren IL-4⁺IFN γ ⁺ Doppelproduzenten ähnlich wenig GATA3 wie IL-4⁺IFN γ ⁻ Zellen (MFI Unterschied nicht signifikant, n=3 Spender) und auch der prozentuale Unterschied an GATA3⁺ Zellen zwischen IL-4⁺IFN γ ⁺ und IL-4⁺IFN γ ⁻ Zellen war statistisch nicht signifikant (n=3 Spender, Tabelle 18).

Interessant war, dass sich auch keine statistische Signifikanz zwischen IL-4⁺IL-13⁻ bzw. IL-4⁺IL-13⁻Produzenten und IL-4⁺IFN γ ⁺ bzw. IL-4⁺IFN γ ⁻ Zellen feststellen ließ.

Tabelle 18: Anteil GATA3⁺ Zellen in den einzelnen Zytokinproduzenten und deren MFI für GATA3

Zytokine	%GATA ⁺ Zellen unter Zytokinproduzenten	MFI GATA3	Signifikanz vs. IL-4 ⁺ IL-13 ⁺ (MFI)	Signifikanz vs. IL-4 ⁺ IL-13 ⁺ (%GATA3 ⁺ Zellen)
IL-4⁺IL-13⁺ (MW\pmSD, n=3)	60,6% \pm 13,5%	3928,0 \pm 503,4	—	—
IL-4⁺IL-13⁺ (MW\pmSD, n=3)	25,8% \pm 10,5%	1954,7 \pm 363,6	p<0,01	p<0,05
IL-4⁺IL-13⁻ (MW\pmSD, n=3)	28,5% \pm 18,0%	1783,3 \pm 298,5	p<0,01	p<0,05
IL-4⁺IFNγ⁺ (MW\pmSD, n=3)	12,3% \pm 4,2%	1422,0 \pm 133,1	p<0,01	p<0,01
IL-4⁺IFNγ⁻ (MW\pmSD, n=3)	4,3% \pm 2,0%	1081,3 \pm 217,0	p<0,01	p<0,01

Zellen von n=3 Spenden wurden mit Antikörpern gegen GATA3 und Zytokine gefärbt. Anschließend wurde die MFI von GATA3 sowie der Anteil an GATA3⁺ Zellen in den unterschiedlichen Zytokinproduzenten verglichen. (p<0,0001, MFI Unterschied zwischen den Populationen/p=0,0012, Unterschied an %GATA3⁺ Zellen zwischen den Populationen. Ergebnisse des anschließenden Tukey HSD Tests sind in der Tabelle vermerkt. Signifikante Unterschiede ergaben sich jeweils nur gegen die Gruppe der IL-4⁺IL-13⁺ Zellen, alle übrigen Kombinationen waren statistisch nicht signifikant.)

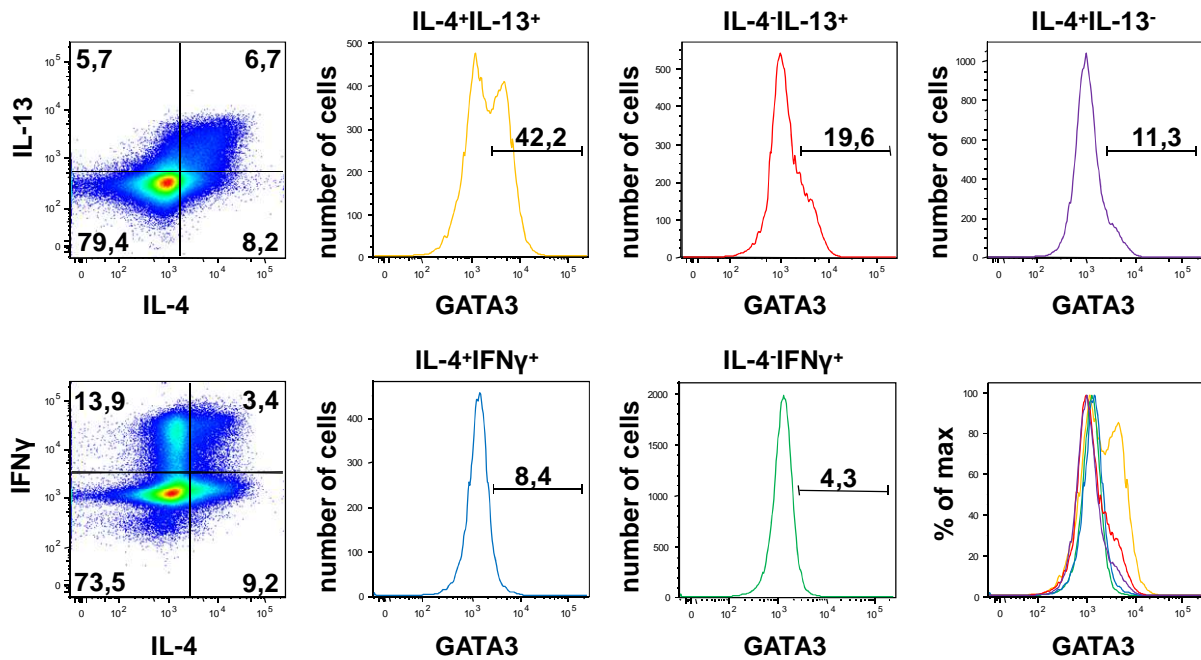


Abbildung 11: Vergleich der GATA3 Expression in CD4⁺ T-Zellen mit verschiedenen Zytokinexpressionsprofilen

Mittels MACS angereicherte CD4⁺ PBMC wurden für 5h mit PMA/Ionomycin in Gegenwart von GolgiStop stimuliert und anschließend gefärbt. In den Dotplots sind CD4⁺ Zellen abgebildet. Die Einzelhistogramme zeigen die GATA3 Expression der jeweiligen Zytokinproduzenten. Rechts unten sind alle Einzeldiagramme zum Vergleich überlappend dargestellt. Die Abbildung ist repräsentativ für n=3 Spender.

IL-4⁺IL-13⁺-Produzenten ■, IL-4⁺IL-13⁻-Produzenten ■, IL-4⁻IL-13⁺-Produzenten ■, IL-4⁺IFNγ⁺-Produzenten ■, IL-4⁺IFNγ⁻-Produzenten ■

Zusammenfassend zeigte sich, dass die durchflusszytometrische Bestimmung der GATA3-Expression nach PMA/Ionomycin Stimulation gut mit der zytokinbasierten Klassifizierung der T-Zellen in Th1, Th2 und Th17 Zellen korreliert und daher als valide angesehen werden kann.

Bei den Untersuchungen zum Transkriptionsfaktor RORγ(t) zeigten IL17-Produzenten eine gegenüber anderen Zytokinproduzenten lediglich leicht erhöhte MFI des TF, die keine statistische Signifikanz erreichte (Abbildung 12 und Tabelle 19). Der Antikörper schien somit für die alleinige Identifikation von Th17 differenzierten Zellen in der FACS-Färbung nicht hilfreich.

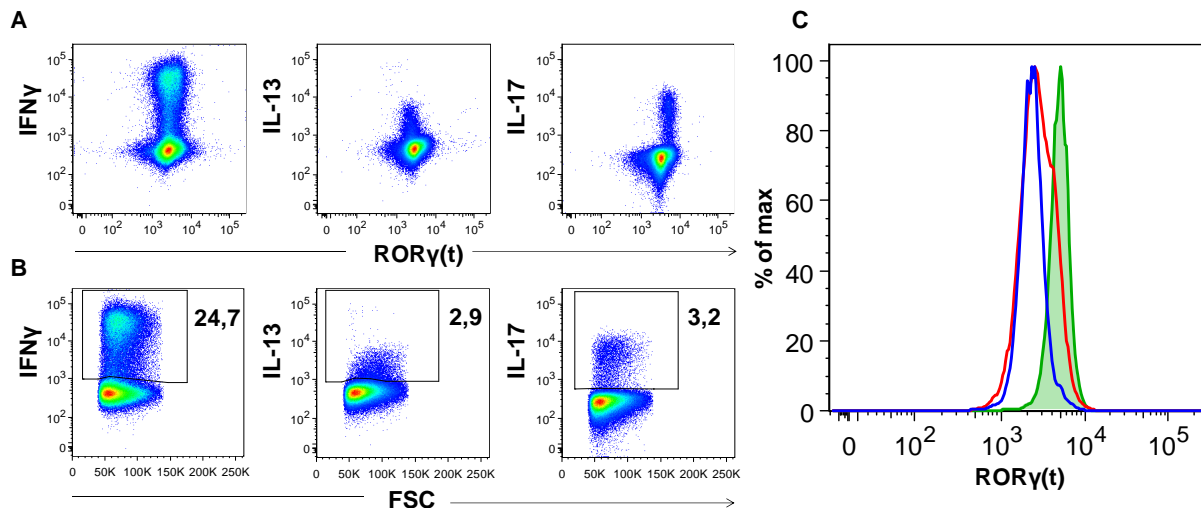


Abbildung 12: RORγ(t)-Expression in IFNγ-, IL-13-, bzw. IL-17-produzierenden CD4⁺ T-Zellen

Mittels MACS angereicherte CD4⁺ PBMC wurden für 5h mit PMA/Ionomycin in Gegenwart von GolgiStop stimuliert und anschließend gefärbt. Die Dotplots zeigen CD4⁺ Lymphozyten. (A) Koexpression von RORγ(t) und IFNγ, IL-13 bzw. IL-17 in CD4⁺ T-Zellen. (B) Gating der IFNγ-, IL-13- bzw. IL-17-Produzenten unter CD4⁺ T-Zellen. (C) RORγ(t)-Expression in IFNγ-, IL-13- bzw. IL-17-Produzenten aus (B). Die Abbildung ist repräsentativ für n=4 Spender. Die Daten aller Messungen sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt.

IFNγ-Produzenten ■, IL-13-Produzenten ■, IL-17-Produzenten ■

Tabelle 19: Populationsgrößen und gemessene MFI von RORγ(t) der untersuchten Zytokinproduzenten

Zytokin	Zytokinproduzenten unter CD4 ⁺	MFI RORγ(t)	Signifikanz vs. IL-17 (MFI)
IFNγ (MW±SD), (n=6)	21,7%±4,3%	2466,5±901,7	p>0,05
IL-13 (MW±SD), (n=4)	2,6%±1,1%	2351,2±857,2	p>0,05
IL-17 (MW±SD), (n=6)	2,0%±0,7%	6448,0±6705,1	—

Der MFI Unterschied zwischen den drei Gruppen war statistisch nicht signifikant, p=0,22.

Somit kann festgehalten werden, dass für die durchflusszytometrische Identifizierung polarisierter/differenzierter T-Zellsubpopulationen lediglich die FOXP3-Färbung zur Identifizierung regulatorischer T-Zellen uneingeschränkt nutzbar ist. Die FACS-Färbung auf GATA3 erscheint dagegen nur in stimulierten CD4⁺ Zellen zur Detektion von Th2 Zellen geeignet, jedoch nicht in unstimulierten CD4⁺ Zellen. Die durchflusszytometrische Identifizierung von Th1 bzw. Th17 Zellen allein durch eine Färbung auf T-bet bzw. RORγ(t) ist mit den bisher kommerziell erhältlichen Antikörpern dagegen nicht möglich.

4.2 Etablierung einer intranukleären FACS-Färbung mit der Möglichkeit der anschließenden RNA-Extraktion

Alle derzeit kommerziell erhältlichen FOXP3 Färbekits enthalten Paraformaldehyd (PFA) als Fixierungsreagenz sowie verschiedene Detergenzien zur Permeabilisierung der Zellmembran. Der Einsatz dieser Reagenzien führt zur Degradation und/oder

Quervernetzung von Nukleinsäuren, Proteinen sowie anderen Zellbestandteilen und verhindert dadurch die Isolierung intakter RNA aus solcherart gefärbten Zellen. Um Treg Zellen, welche während der *in vitro* Expansion FOXP3 verlieren, auf RNA-Ebene näher untersuchen zu können, bedurfte es daher der Entwicklung einer neuen Färbemethode, die einerseits eine durchflusszytometrische Separation der Zellen auf der Basis ihrer FOXP3-Expression ermöglicht, andererseits aber auch die anschließende Extraktion intakter RNA erlauben sollte. Im Folgenden wurde daher eine alternative Färbemethode durch Testung verschiedener Fixierungs- und Permeabilisierungslösungen sowie Färbepuffer für die FOXP3-Färbung (und potentiell auch für andere intranukleäre Antigene) entwickelt. Untersucht wurden Ethanol und Methanol zur Zellfixierung und Permeabilisierung in Kombination mit Puffern verschiedener Zusammensetzung für die anschließenden Färbeschritte. Dabei galt das Augenmerk zunächst der Etablierung einer validen alternativen FACS-Färbung, als positiver Vergleichsstandard diente hierbei ein kommerziell erhältliches FOXP3 *Staining Set* (eBioscience). Durchgeführt wurden die Färbungen an frischen PBMC.

Zur Fixierung und Permeabilisierung wurden zunächst Methanol und Ethanol in verschiedenen Konzentrationen (50%, 70% und 100%) mit anschließender FOXP3-Färbung getestet. Alkohole entfalten ihre zellfixierende Wirkung vor allem durch die Verdrängung intrazellulärer Flüssigkeit und nicht durch die Induktion von Quervernetzungen, wie das in allen konventionellen Färbekits enthaltene PFA. Als Färbepuffer diente zunächst der schon bei der Oberflächenfärbung verwendete FACS-Puffer (PBS mit 2% FCS). Nach Färbung der Oberflächenantigene CD4 und CD25 (s. Kapitel 3.2.5.1) wurde unter ständigem Vortexen 500µl des gewünschten eiskalten Permeabilisierungsreagenz (Ethanol oder Methanol) zugegeben. Folgend wurden die Zellen für 15min bei -20°C inkubiert und dann in 2ml FACS-Puffer gewaschen. Das Waschen der Zellen wurde zur vollständigen Entfernung des Alkohols noch einmal wiederholt und die Zellen danach in 1ml FACS-Puffer aufgenommen. Anschließend erfolgte die FOXP3-Färbung wie in Kapitel 3.2.5.2 beschrieben, jedoch unter Verwendung von normalem FACS-Puffer.

Sowohl mit Ethanol, als auch mit Methanol in 70%iger Konzentration ließen sich mit dem eBioscience Kit vergleichbare Färbungen für CD4 (FITC), CD25 (PE) und FOXP3 (Allophycocyanin) erzielen (Abbildung 13). Die anderen getesteten Konzentrationen zeigten in der FACS-Färbung keine mit dem konventionellen Färbekit vergleichbaren Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der nahezu identischen Ergebnisse mit Ethanol und Methanol als Fixierungsreagenz in 70%iger Konzentration wurde für die weiteren Versuche 70%iger Ethanol verwendet. So konnte die erhöhte Toxizität des Methanols vermieden werden.

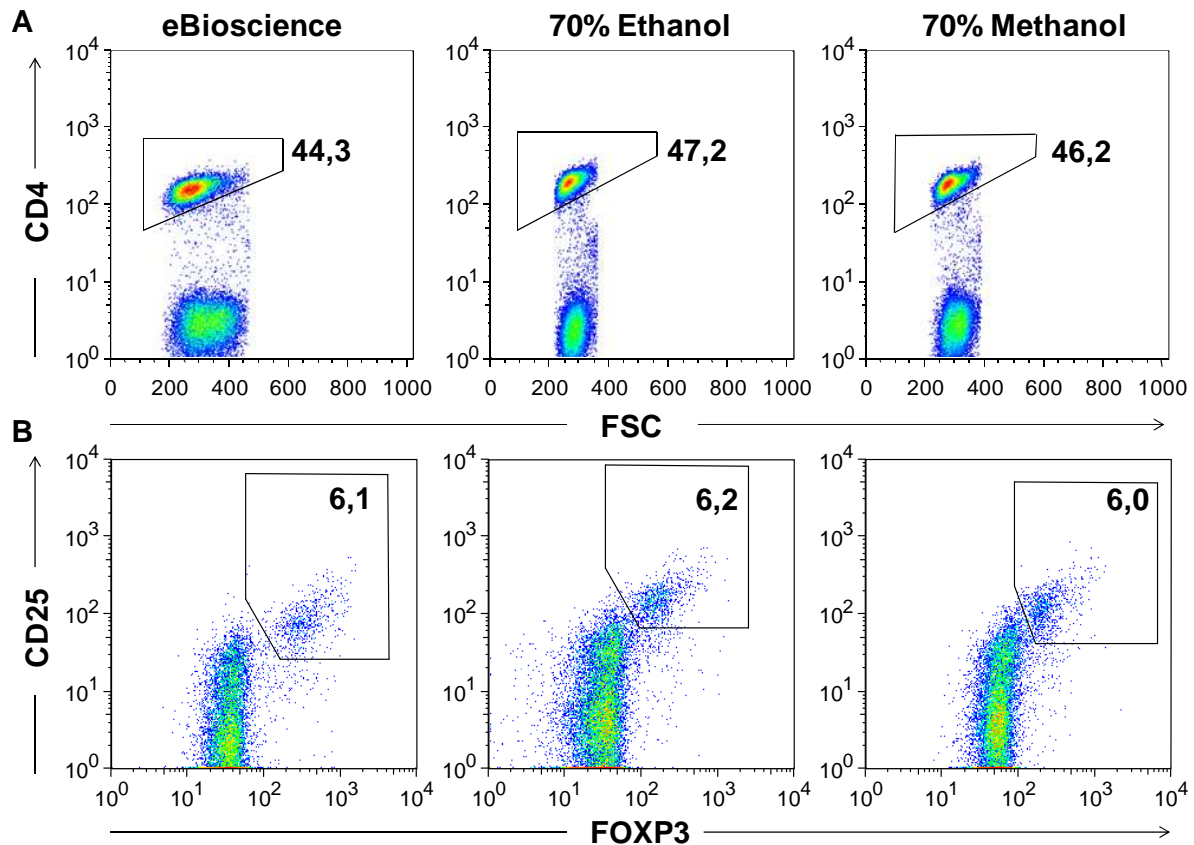


Abbildung 13: Oberflächenfärbung und intranukleäre FOXP3-Färbung nach Fixierung und Permeabilisierung mit Ethanol bzw. Methanol im Vergleich zum kommerziell erhältlichen Färbeset

Die Färbung erfolgte an unstimulierten PBMC mit dem angegebenen Fixierungs-/Permeabilisierungsreagenz. Alle Färbeschritte erfolgten in FACS-Puffer. Die Dotplots zeigen in (A) Lymphozyten und in (B) $CD4^+$ Lymphozyten. In (A) ist die Färbung und das Gating auf $CD4^+$ Zellen dargestellt (anti- $CD4$ -FITC). (B) zeigt das Färbeergebnis mit den Antikörpern $CD25$ -PE und $FOXP3$ -Allophycocyanin. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel ($n > 5$ für eBioscience, $n = 7$ für Ethanol, $n = 4$ für Methanol, Messungen an Zellen von unterschiedlichen Spendern).

Im nächsten Schritt sollte der RNA Gehalt der mit Ethanol fixierten und permeabilisierten Zellen untersucht werden. Der zunächst verwendete FACS-Puffer wurde hierfür zunächst durch pures PBS ersetzt, um eine mögliche negative Beeinflussung der Ergebnisse (durch eine Kontaminierung der Proben mit möglicherweise im FACS-Puffer enthaltene RNasen) auszuschließen. Die Qualität der FACS-Färbung änderte sich hierdurch nicht (Abbildung 14).

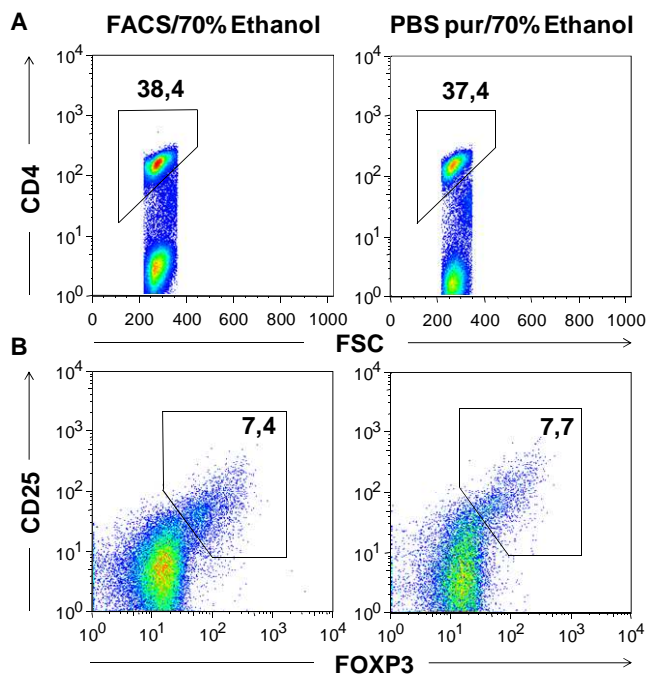


Abbildung 14: Oberflächenfärbung und intranukleäre FOXP3-Färbung in FACS-Puffer bzw. in purem PBS nach Fixierung und Permeabilisierung mit 70%igem Ethanol

Die Färbung erfolgte an unstimulierten PBMC, die Dotplots zeigen in (A) Lymphozyten und in (B) CD4⁺ Lymphozyten. (A) zeigt die Färbung und das Gating auf CD4⁺ Zellen. (B) zeigt das Färbeargebnis mit den Antikörpern CD25-PE und FOXP3-Allophycocyanin. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel (n=7 Spender für FACS-Puffer, n=4 Spender für pures PBS).

Trotz der Färbung in PBS und dem zügigen Verarbeiten der Proben auf Eis, zeigte sich die anschließend isolierte RNA vollständig degradiert (Abbildung 15A). Ethanol selbst bewirkt in der Regel keine RNA-Degradation, vielmehr ist es Bestandteil nahezu jeder RNA-Isolationsmethode und dient der RNA-Präzipitation. Daher wurde im Folgenden versucht, den Färbepuffer durch den Zusatz verschiedener proteinhaltiger Lösungen dahingehend zu modifizieren, dass eine RNA-Stabilisierung erreicht wird. Die Effekte der verschiedenen Färbepuffer auf die RNA-Qualität wurden mittels Agarosegelen und Bioanalyser getestet.

Als Puffer wurde PBS mit unterschiedlichen Mengen an fötalem Kälberserum (FCS), Trypton oder Humanalbumin (HA) versetzt und dieses jeweils kombiniert mit der Fixierung/Permeabilisierung in 70%igem Ethanol. Den Puffern wurden zudem vor der Zellfärbung jeweils 20µl/ml des RNase Inhibitors RNasin hinzugefügt, um einen Schutz der RNA vor möglicherweise verbleibenden RNasen in den Proben zu erhöhen. Zusätzlich wurden die Puffer, welche durch den Zusatz von FCS und Trypton entstanden, mit 0,1% DEPC versetzt und autoklaviert. Zur Extraktion der RNA wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet, eine Phasenseparationstechnik mittels TRIzol der Firma Invitrogen und eine säulenbasierte Technik der Firma Qiagen. Besonders wichtig für den Erhalt qualitativ hochwertiger RNA ist ferner die Beachtung der Zeitkomponente. Es bedarf einer kontinuierlichen Kühlung und einer raschen Verarbeitung der Proben. Als Referenz diente die RNA aus unfixierten Zellen, als Qualitätsmerkmal bei der RNA-Gelelektrophorese wurden die 28S und 18S ribosomalen RNA Banden begutachtet. Wie in Abbildung 15A ersichtlich, wurde durch den bloßen Zusatz von 0,1%igem Diethylpyrocarbonat (DEPC) zu PBS (zur möglichen Inaktivierung doch noch vorhandener RNasen) und nachfolgendem Autoklavieren keine Verbesserung der RNA-Qualität erreicht. Der Zusatz von 2% Trypton zu PBS lieferte

hingegen, unabhängig von der gewählten RNA-Extraktionsmethode, mit dem unfixierten Standard vergleichbare Ergebnisse.

Daher wurden im nächsten Schritt unterschiedliche Mengen an Trypton als Zusatz zum Färbepuffer getestet (Abbildung 15B). Es zeigte sich, dass bei der Verwendung höherer Tryptonkonzentrationen (>2%) die Schärfe der Banden zunahm. Beim Zusatz von geringeren Tryptonkonzentrationen nahm die Integrität der RNA hingegen rasch ab. Die minimale Tryptonkonzentration zum Erhalt klarer ribosomaler RNA Banden betrug 2% (Abbildung 15B).

Ebenfalls getestet wurden die Auswirkungen von FCS als Zusatz zum Färbepuffer, insbesondere da dieser Zusatz gute Ergebnisse in den vorangehenden FACS-Färbungen lieferte (Abbildung 13 und Abbildung 14). Hier ließ sich jedoch auf den unterschiedlichen Spuren für alle getesteten Konzentrationen allenfalls fragmentierte RNA nachweisen (Abbildung 15B).

Im nächsten Schritt sollten noch die Auswirkungen einer Färbung in PBS zusammen mit verschiedenen Humanalbumin (HA)-Konzentrationen auf die RNA-Qualität untersucht werden. Hier konnten auf den Agarosegelen allerdings auch nur fragmentierte RNA, aber keine scharfen Banden detektiert werden (Abbildung 15C).

Die beste RNA-Qualität wurde somit, unabhängig von der verwendeten RNA Extraktionsmethode, unter Verwendung von PBS mit mindestens 2% Trypton als Färbepuffer erreicht.

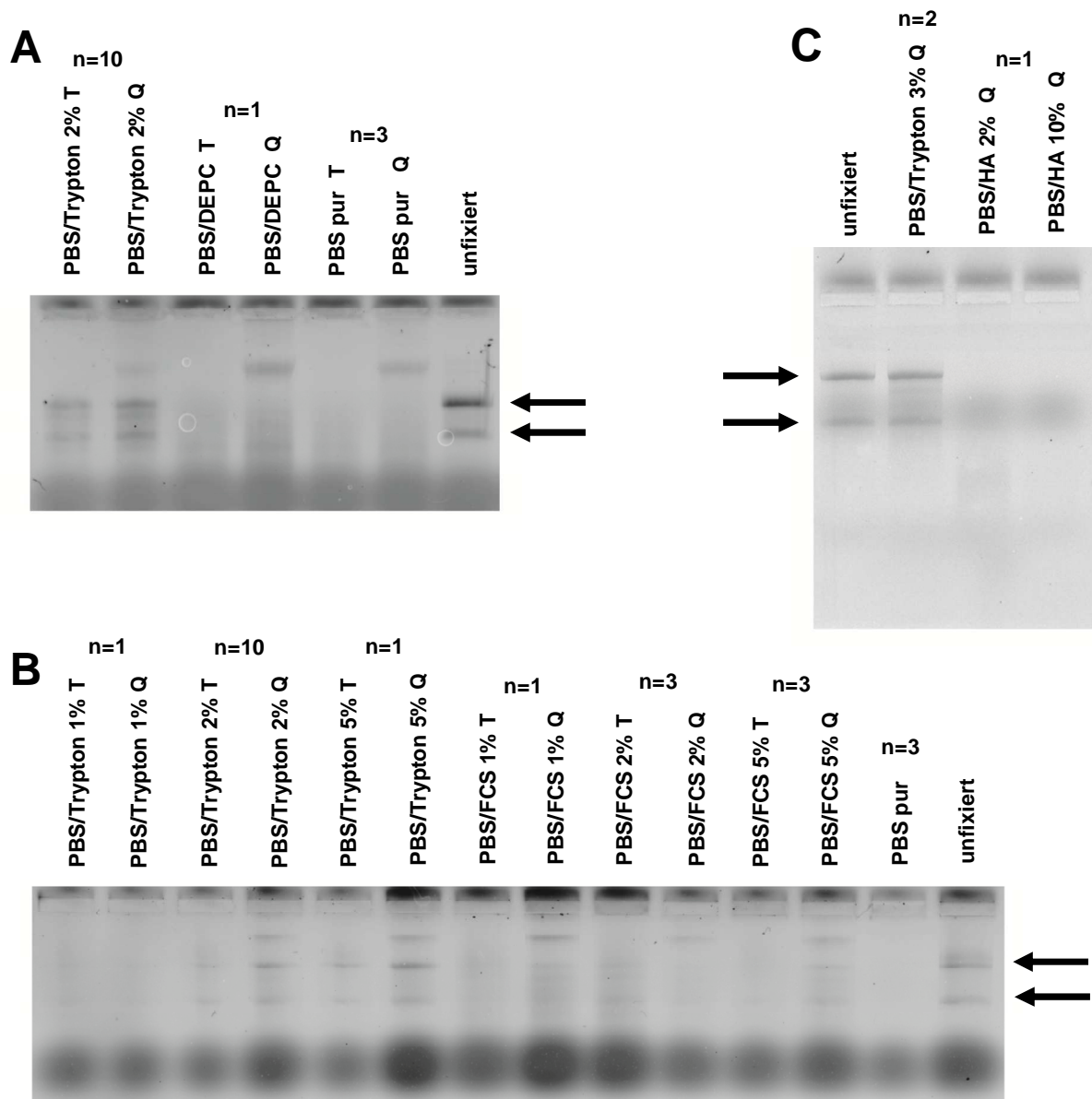


Abbildung 15: Agarose-Gelelektrophoresen von RNAs aus in vitro expandierten Treg nach Ethanolfixierung und Färbung mit unterschiedlichen Puffern im Vergleich zu unfixierten Zellen

Die RNA wurde mittels TRIzol (T) oder Qiagen (Q) (Kapitel 3.2.6) aus unfixierten oder ethanolfixierten in vitro expandierten Treg nach FACS-Färbung in PBS (PBS pur), PBS versetzt mit unterschiedlichen Konzentrationen an Trypton (PBS/Trypton), FCS (PBS/FCS) oder Humanalbumin (PBS/HA) bzw. PBS mit 0,1%igem DEPC (PBS/DEPC) extrahiert. Die abgebildeten Gelspuren sind für die jeweils hinter der Beschriftung angegebene Anzahl an Spendern repräsentativ.

Durch die Analyse mittels Agarosegele und des Bioanalyzer zeigte sich, dass Trypton bis zu einer minimalen Konzentration von 2% als geeigneter Zusatz zu PBS erscheint, um intakte RNA nach einer intranukleären Färbung zu erhalten. Im Folgenden wurden daher FACS-Färbungen nach Fixierung/Permeabilisierung mit 70%igem Ethanol in PBS mit Tryptonpuffer im Vergleich zum bisher verwendeten FACS-Puffer bzw. zur Färbung mit dem kommerziell erhältlichen Färbekit durchgeführt.

Bereits durch den Zusatz der minimal erforderlichen Menge von 2% Trypton zum Färbepuffer wurden jedoch die Fluoreszenzsignale der Antikörper, insbesondere die des anti-CD25-PE Antikörpers, im Vergleich zu den anderen Methoden/Zusätzen beeinträchtigt (Abbildung 16). Demnach erschien die Zugabe von 2% Trypton zu PBS im Färbepuffer als bestmöglicher Kompromiss zwischen einer akzeptablen FACS-Färbung und dem anschließendem Erhalt qualitativ hochwertiger RNA. Dies stellte insbesondere für die hier verfolgten Ziele eine Lösung dar, da einerseits nach der Färbung mit anti-CD4-FITC mit allen Puffern eine eindeutige Diskriminierung zwischen CD4⁺ und CD4⁻ Zellen möglich war (Abbildung 16) und andererseits die FOXP3-Färbung mit dem Allophycocyanin-markierten Antikörper durch den Zusatz von Trypton zum Färbepuffer unabhängig von der CD25 Expression kaum beeinträchtigt war (Abbildung 16). Somit war die nähere Untersuchung *in vitro* expandierter Treg Zellen auf RNA-Ebene, nach intranukleärer Färbung und anschließender Sortierung in eine FOXP3⁺ und eine FOXP3⁻ Population, möglich.

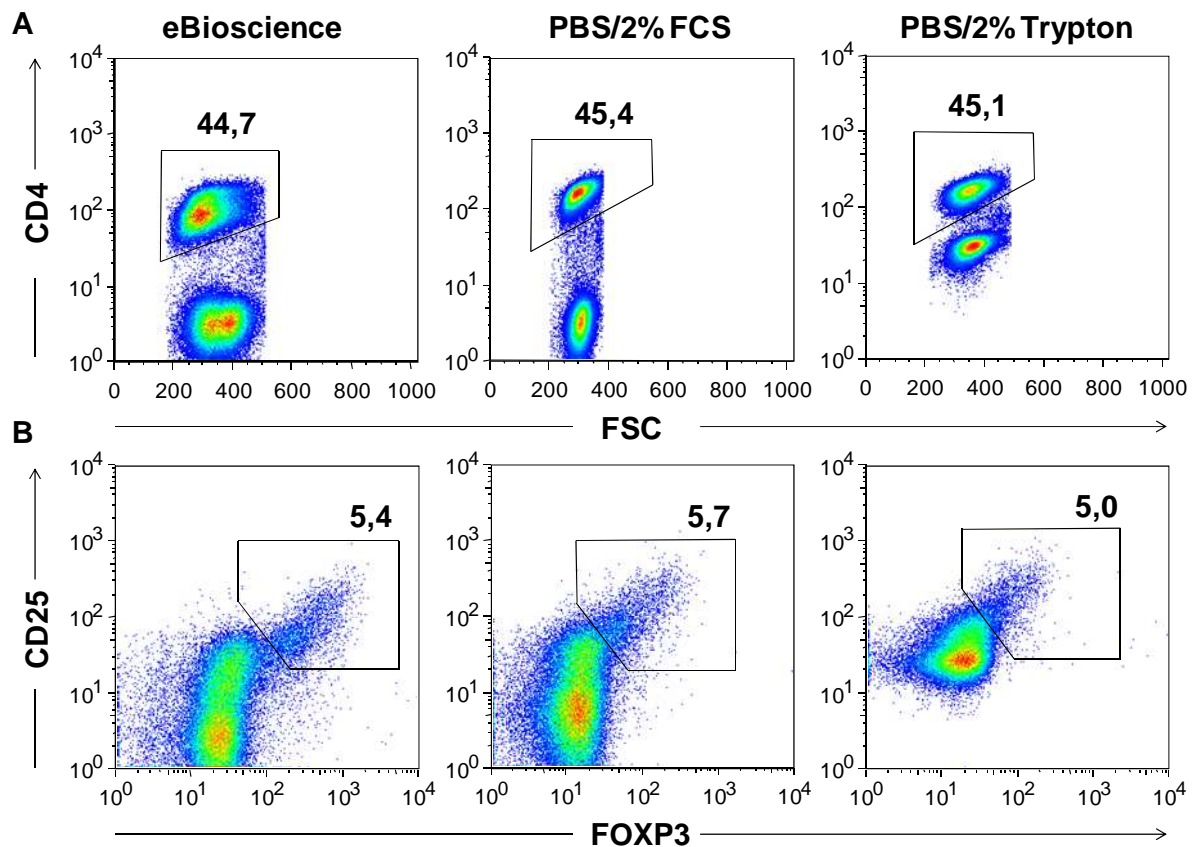


Abbildung 16: FACS-Färbungen unter Verwendung unterschiedlicher Puffer für die intranukleäre FOXP3-Färbung

Abgebildet sind die Färbungen von PBMC unter Verwendung von PBS mit 2% Tryptonpuffer, FACS-Puffer bzw. dem kommerziellen Puffer (jeweils mit 70%igem Ethanol zur Fixierung/Permeabilisierung). Dargestellt sind in (A) Lymphozyten und in (B) CD4⁺ Zellen. Die Dotplots sind repräsentativ für n>5 (eBioscience), n=7 (PBS/2% FCS) und n=3 (PBS/2% Trypton) Spender.

Dies bestätigten auch die nachfolgend durchgeführten Färbungen von *in vitro* expandierten CD45RA⁻ Treg unter Verwendung von 70%igem Ethanol zur Fixierung/Permeabilisierung in

2%igem Tryptonpuffer zur intranukleären Färbung. Wie in Abbildung 17A gezeigt, ergab dieser Ansatz eine gute Auftrennung der Zellen in eine FOXP3⁺ und eine FOXP3⁻ Population. Als Vergleichsstandard für die daraufhin am Bioanalyzer durchgeführte RNA Integritätsmessung (RIN= *RNA integrity number*) diente die RNA unfixierter, nicht permeabilisierter, unsortierter Zellen. Die RNA aus den mit Hilfe der neuen Methode gefärbten Zellen zeigt dabei, wie aus Abbildung 17B ersichtlich, eine mit RNA aus unbehandelten Zellen vergleichbar hohe Qualität (Fixierte Zellen: RIN-MW 7,9; Divergenzbereich von 7,3-9,0 bei n=14 Spendern; unfixierte Zellen: RIN MW 9,4; Divergenzbereich von 9,2-9,5 bei n=5 Spendern).

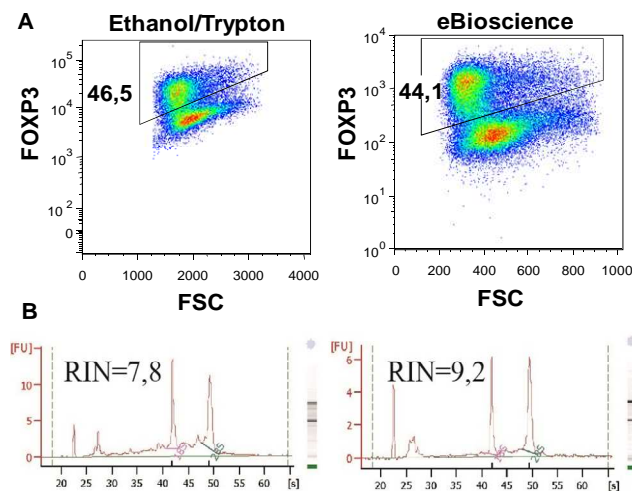


Abbildung 17: FACS-Separation *in vitro* expandierter Treg in FOXP3⁺ und FOXP3⁻ Fraktionen und anschließende Extraktion von RNA

(A) CD45RA⁻ Treg wurden *in vitro* expandiert, für CD4 gefärbt und anschließend mit dem eBioscience Kit (rechts) oder der Ethanol/Trypton Methode (links) intranukleär für FOXP3 gefärbt. Die Plots zeigen CD4⁺ Lymphozyten und sind repräsentativ für n=4 Spender. Die gemessene Häufigkeit FOXP3⁺ Zellen wies mit der neuen Methode einen Divergenzbereich von -10,6% bis +5,7% auf. (B) Bioanalyzer-Elektropherogramme von RNA aus *in vitro* expandierten CD45RA⁻ Treg Kulturen. Die RNA wurde aus ethanolfixierten Zellen mit anschließender FACS-Färbung und

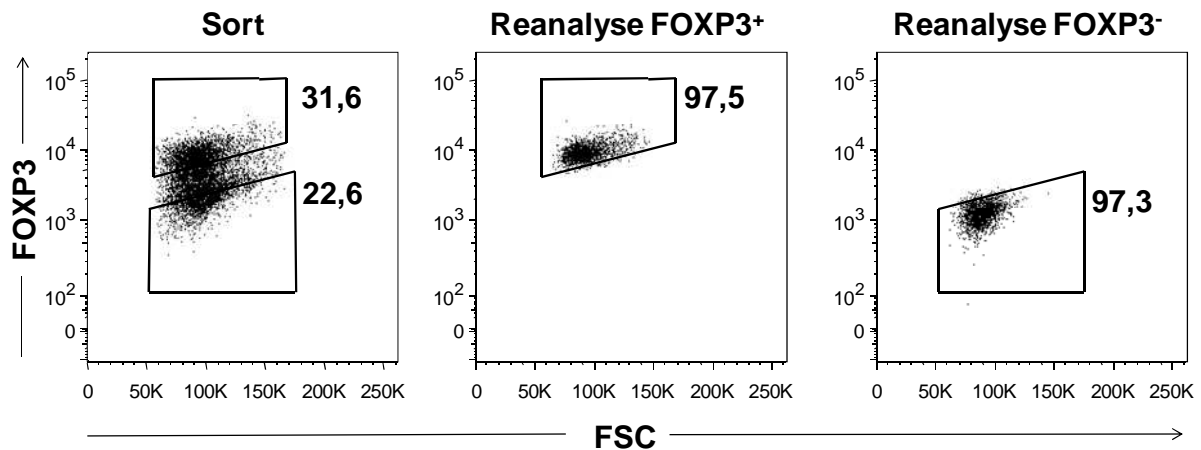
Separation in Tryptonpuffer (70%iger Ethanol und 2% Trypton in PBS; linkes Elektropherogramm) bzw. unfixierten und ungefärbten Zellen (rechtes Elektropherogramm) extrahiert. Repräsentativ für n=14 (links) bzw. n=5 (rechts) Spender. Modifiziert nach [154].

Im Folgenden sollte die neu entwickelte Färbemethode verwendet werden, um *in vitro* expandierte CD45RA⁻ Treg mit Hilfe des FACSAria Zellsorters in FOXP3⁺ und FOXP3⁻ Zellen zu sortieren. Um die Degradation der RNAs in den Zellen während des Zellsorts zu verhindern, wurde auch hierfür der neu entwickelte Tryptonpuffer (PBS mit 2% Trypton und 20µl/ml RNasin, 0,1% DEPC; autoklaviert) verwendet. Die Ergebnisse entsprachen der Referenzmethode und Reanalysen der mit der neuen Methode durchgeführten Sorts ergaben eine Reinheit von >95% in Bezug auf FOXP3 (Abbildung 18 und Tabelle 20, n=5).

Nach FOXP3-Färbung in PBS mit 2% Trypton ließen sich somit *in vitro* kultivierte Treg - Zellen erfolgreich hinsichtlich vorhandener FOXP3-Expression sortieren und anschließend aus diesen Zellen qualitativ hochwertige RNA extrahieren (Abbildung 15, Abbildung 17 und Abbildung 18).

Tabelle 20: Reanalysen der sortierten FOXP3⁺/⁻ Populationen nach Färbung mit 70% Ethanol/2% Trypton

Kultur #	FOXP3 ⁺ Zellen	FOXP3 ⁻ Zellen
Kultur 1	97,7%	96,8%
Kultur 2	97,5%	97,3%
Kultur 3	96,7%	99,0%
Kultur 4	95,0%	97,8%
Kultur 5	97,9%	98,5%
MW±SD	97,0%±1,1%	97,9%±0,8%

**Abbildung 18: Zellsortierung anhand der FOXP3-Expression und anschließende Reanalysen der erhaltenen Populationen**

CD45RA⁺ Treg wurden *in vitro* expandiert, für CD4 gefärbt und anschließend mit der Ethanol/Trypton Methode intranukleär für FOXP3 gefärbt. Links sind die angewandten Sortgates ersichtlich und rechts die entsprechende Reanalyse der erhaltenen Populationen repräsentativ dargestellt (n=5 unabhängige Spender).

Zusammenfassend wurde somit folgendes Protokoll für die intranukleäre Färbung von FOXP3 mit der Möglichkeit zur anschließenden RNA Extraktion etabliert:

Für alle Wasch- und Inkubationsschritte wird DEPC-versetztes PBS mit 2% Trypton verwendet. Der Puffer wird zur Inaktivierung von DEPC autoklaviert, bei 4°C aufbewahrt und im Folgenden als Tryptonpuffer bezeichnet. Nach Oberflächenfärbung (Kapitel 3.2.5.1, CD4-FITC) in Tryptonpuffer (anstatt FACS-Puffer) werden unter ständigem Vortexen 500µl eiskalter 70%iger Ethanol zu maximal 2×10^7 Zellen hinzugegeben und die Zellen für 15min bei -20°C inkubiert. Im Anschluss werden 2ml des Tryptonpuffers hinzugegeben und die Zellen gewaschen. Dieser Schritt wird zur vollständigen Entfernung des Alkohols noch einmal wiederholt und die Zellen (max. 2×10^7) in 1ml Tryptonpuffer aufgenommen. Als nächstes werden 20µl Rattenserum sowie 20µl rekombinantes RNasin (RNase Inhibitor 20-40U/µl) hinzugegeben und nach 5min Inkubation bei 4°C auch 50µl des Allophycocyanin-markierten FOXP3 Antikörpers. Es folgt die Inkubation der Suspension für 30min in Dunkelheit (4°C). Zum Schluss werden die Zellen einmal in 2ml Tryptonpuffer gewaschen und in 1ml Tryptonpuffer pro 1×10^7 Zellen für die durchflusszytometrische Zellsortierung aufgenommen.

4.3 Immunophänotypisierung FOXP3-instabiler regulatorischer T-Zellen mittels Durchflusszytometrie und Gesamt-Genom-Microarrays

4.3.1 Transkriptomanalyse *in vitro* expandierter Treg mit heterogener FOXP3-Expression

Im nächsten Schritt sollte die neu entwickelte Färbetechnik verwendet werden, um RNA aus *in vitro* expandierten $CD4^+CD25^{high}CD45RA^-$ Treg mit heterogener FOXP3-Expression zu extrahieren und anschließend die Genexpressionsprofile der FOXP3⁺ und FOXP3⁻ Zellen zu vergleichen. Hierdurch erhoffte man sich neue Erkenntnisse über den Differenzierungsweg *in vitro* expandierter Treg instabilen Phänotyps.

In vitro expandierte $CD4^+CD25^{high}CD45RA^-$ Treg wurden mit Hilfe des FACSAria Zellsorters in FOXP3⁺ und FOXP3⁻ Zellen sortiert (Abbildung 19). Die Färbung der Zellen geschah gemäß oben stehendem Protokoll. Alle Schritte, von der Oberflächenfärbung bis zum Sortieren der Zellen, erfolgten unter Verwendung von Tryptonpuffer. Zur Veranschaulichung sind die gewählten Sortgates in Abbildung 19 wiedergegeben:

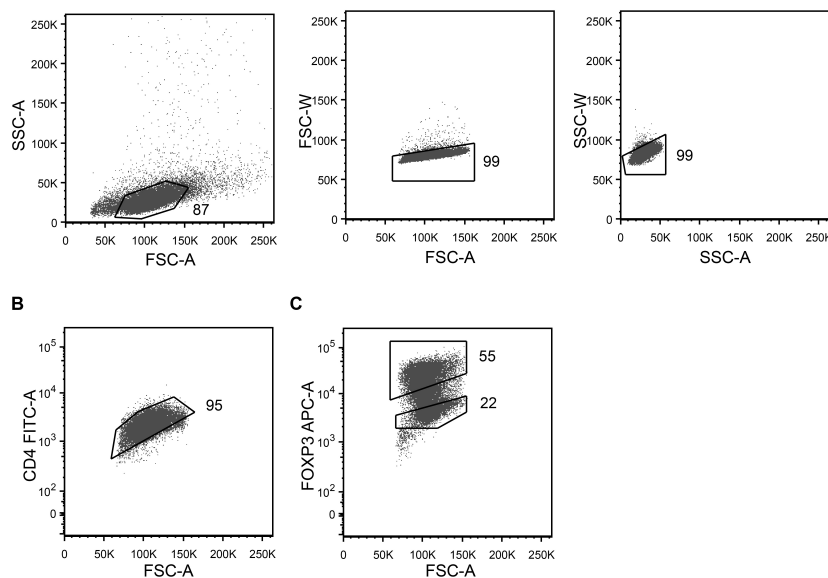


Abbildung 19: Gating zur Separation FOXP3⁺ und FOXP3⁻ *in vitro* expandierter CD45RA⁻ Treg nach Färbung in Ethanol/Trypton

*CD45RA⁻ Treg wurden *in vitro* expandiert und oberflächen- sowie intrazellulär mit Hilfe der Ethanol/Tryptonmethode gefärbt. (A) Gating auf einzelne Lymphozyten basierend auf Größe und Granularität der Zellen. (B) Gating auf CD4⁺ Zellen. (C) Gates für FOXP3⁺ und FOXP3⁻ Zellen. Die Abbildung ist repräsentativ für n=5 Zellsortierungen [154].*

Auf gleiche Weise wurde RNA von 5 verschiedenen Spendern gewonnen. Die RNA der beiden Populationen stand nun für eine vergleichende Analyse des Transkriptoms mittels Gesamt-Genom-Microarrays zur Verfügung, welche im Rahmen eines Kooperationsprojekts von Christian Schmidl unter Leitung von Prof. M. Rehli angefertigt wurde.

In Abbildung 20 ist ein Ausschnitt der Ergebnisse zu sehen, auf dem die relativen Genexpressionslevel ausgewählter Gene farblich kodiert als Heatmap gezeigt werden. Blau steht in der Abbildung für eine relativ gesehen niedrige, rot entsprechend für eine hohe

mittlere Expressionsrate der angegebenen RNA-Sequenzen von allen Spendern. Als interne Kontrolle diente die Betrachtung des Expressionslevels von FOXP3 in den beiden Populationen.

Wie erwartet hatten hoch rein gesortete FOXP3⁺ Zellen einen wesentlich höheren FOXP3 RNA-Gehalt als FOXP3⁻ Zellen. Auch in weiteren Treg Signaturgenen zeigten sich die erwarteten Expressionsmuster in FOXP3⁺ und FOXP3⁻ Zellen. Entsprechend wiesen FOXP3⁺ Zellen eine starke CTLA4 und IL-2R α Expression auf, während diese in FOXP3⁻ Zellen schwach exprimiert wurden (Abbildung 20). Die interne Kontrolle der Analysen zeigte somit stimmige Ergebnisse.

Betrachtet man die Expressionslevel an Genen, welche für Th-assoziierte Zytokine kodieren, fiel vor allem eine verstärkte Expression von Th2 Zytokingenen (IL-4, IL-5, IL-13) in FOXP3⁻ Zellen auf. In der Genexpression anderer linienspezifischer Zytokine (IFN γ , IL-17) zeigten die beiden Populationen hingegen keinen signifikanten Unterschied.

Auch in den Genexpressionsleveln, der für die einzelnen T-Helferzellpopulationen spezifischen Transkriptionsfaktoren, zeigte sich eine erhöhte Expression Th2 assoziierter Transkriptionsfaktoren (GATA3, GFI1) in FOXP3⁻ verglichen mit FOXP3⁺ Zellen (Abbildung 20). Zudem stellte sich ein signifikanter Unterschied in der Expression des Gens *G protein-coupled receptor 44* (GPR44) dar, welches ein linienspezifisches G-Protein der Th2 Zelldifferenzierung (CD294) kodiert. STAT1 und RORC, welche eine Entwicklung der FOXP3-instabilen Treg in Richtung Th1 oder Th17 Zellen aufzeigen würden, waren in FOXP3⁻ Zellen demgegenüber signifikant niedriger als in FOXP3⁺ Zellen exprimiert. Somit ließ sich auf Genexpressionsebene vermuten, dass *in vitro* expandierte CD45RA⁻ Treg, die FOXP3 in Kultur herunterregeln, eine Differenzierung in Richtung Th2 Zellen aufweisen.

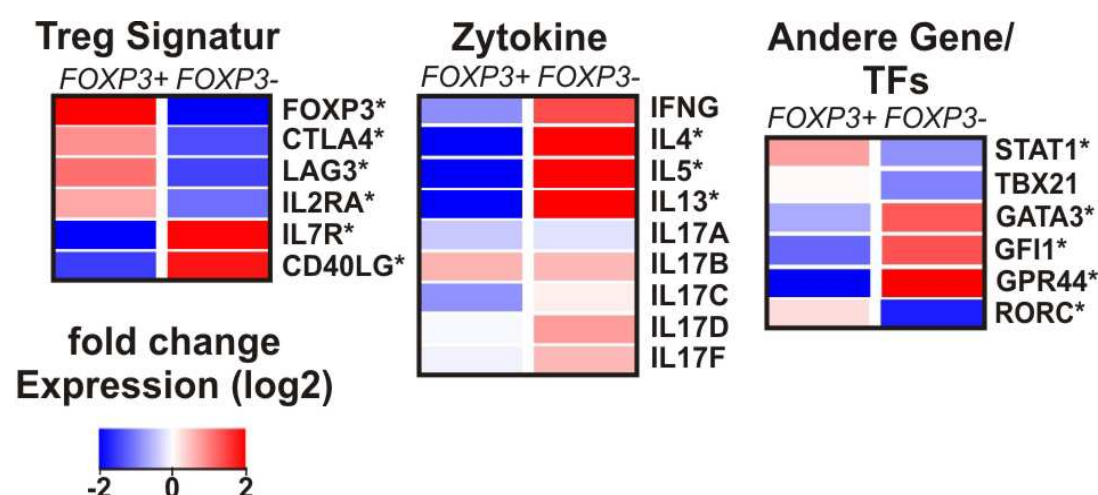


Abbildung 20: Transkriptomanalyse humaner FOXP3 selektierter *in vitro* expandierter CD45RA⁻ Treg

Relative Genexpressionslevel ausgewählter Gene in FOXP3-selektierten *in vitro* expandierten CD45RA⁻ Treg aus $n=5$ voneinander unabhängigen RNA Präparationen sind als Heatmap dargestellt. Gene mit signifikant unterschiedlicher Expression (≥ 2 -fach) zwischen den FOXP3⁺ und FOXP3⁻ sortierten Populationen sind mit „*“ gekennzeichnet. Modifiziert nach [154].

4.3.2 Analyse *in vitro* expandierter Treg auf Proteinebene mittels FACS und Verifizierung ausgewählter Microarraydaten

Auf Transkriptomebene zeigte sich die Entwicklung von Treg Zellen zu Th2 Zellen nach Verlust ihrer FOXP3-Expression. Zur Verifizierung dieser Ergebnisse und zur weiteren Analyse der Zellen auf Proteinebene wurden *in vitro* expandierte CD45RA⁻ Treg nun mittels FACS untersucht. Um neben Zytokinen und dem intranukleären Treg-Marker FOXP3 auch die Expression weiterer zelllinienspezifischer Transkriptionsfaktoren auf Proteinebene untersuchen zu können, wurden die FACS-Färbungen mit den Antikörpern gegen T-bet, GATA3 und RORγ(t) in Kapitel 4.1 auf ihre Aussagekraft hin untersucht und stehen nun (soweit dies möglich war) für diese erweiterten FACS Analysen zur Verfügung.

In vitro expandierte CD45RA⁻ Treg wurden zunächst mit PMA/Ionomycin stimuliert und danach simultan mit Antikörpern gegen FOXP3 sowie die linienspezifischen Zytokine IL-4, IL-13, IFNγ und IL-17 gefärbt.

Wie in Abbildung 21 gezeigt, konnten nach Stimulation in *in vitro* expandierten CD45RA⁻ Treg sowohl IL-4- und IL-13-, als auch IL-17- und IFNγ-Produzenten detektiert werden. Dabei traten IL-4- und IL-13-positive Zellen signifikant häufiger auf als IFNγ- oder IL-17-positive Zellen ($p < 0,0001$; $p < 0,01$ zwischen jeweils IL-4-positiven Zellen verglichen mit jeweils IFNγ-/IL-17-positiven Zellen, $p < 0,01$ zwischen IL-13-positiven Zellen verglichen mit jeweils IFNγ-/IL-17-positiven Zellen, $n=10-17$, Tabelle 21) [154].

Übereinstimmend mit den Microarraydaten traten IL-4- und IL-13-Produzenten dabei überwiegend in den Zellen auf, die FOXP3 während der Expansion verloren hatten (Abbildung 21 und Tabelle 21). Ebenfalls kongruent mit den Ergebnissen aus der Transkriptomanalyse wurde IL-17(A) generell wenig produziert (dabei jedoch mehr unter FOXP3⁺ Zellen). IFNγ fand sich nach *in vitro* Expansion der CD45RA⁻ Treg ebenfalls übereinstimmend mehr in FOXP3⁻ Zellen, wurde jedoch auf einem niedrigerem Level exprimiert als IL-4 bzw. IL-13.

Somit war auf Proteinebene, in Übereinstimmung mit den Daten aus den RNA Microarrays, davon auszugehen, dass *in vitro* expandierte CD45RA⁻ Treg nach Verlust der FOXP3-Expression überwiegend einen Th2 Phänotyp entwickeln. Dies war umso erstaunlicher, da laut Literatur die Entwicklung von Th17 aus Treg Zellen vorbeschrieben war, nicht jedoch die Differenzierung zu Th2 Zellen. Zudem verifizierten die erhaltenen Ergebnisse die Microarraydaten, welche unter Verwendung der neuen Färbemethode gewonnen wurden.

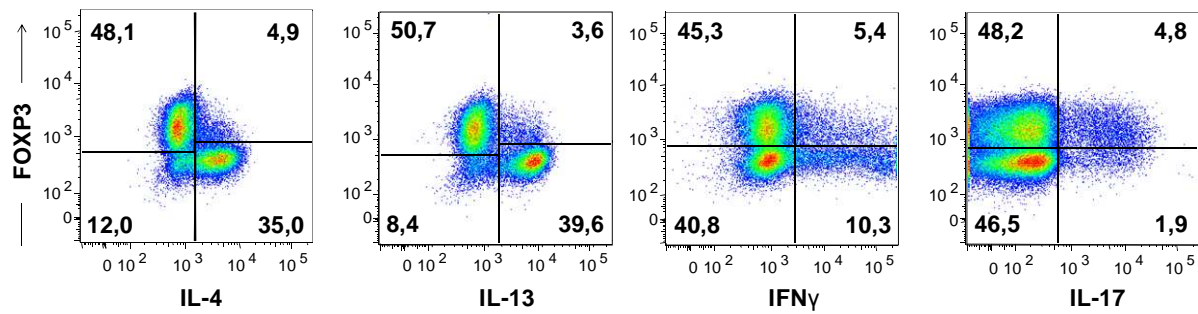


Abbildung 21: Zytokinexpression in in vitro expandierten CD45RA⁻ Treg in Abhängigkeit von FOXP3

CD45RA⁻ Treg wurden *in vitro* expandiert und anschließend mit PMA/Ionomycin in Gegenwart von GolgiStop stimuliert. Die Dotplots zeigen CD4⁺ Zellen. Dargestellt ist die Expression der angegebenen Zytokine im Bezug zur FOXP3-Expression. Die Dotplots sind für n=10-17 voneinander unabhängige Experimente mit Zellen aus jeweils unterschiedlichen Spendern repräsentativ. Aus allen Messungen ergeben sich folgende Werte:

(FOXP3⁺ Population in *in vitro* expandierten CD45RA⁻ Treg: 54,4%±18,1%, MW±SD, n=18 Spender). Modifiziert nach [154].

Tabelle 21: Anteil der zytokinproduzierenden FOXP3-stabilen bzw. -instabilen unter den gesamten *in vitro* expandierten CD45RA⁻ Treg.

Zytokin	Anteil FOXP3 ⁺ Zytokin ⁺ Zellen an den gesamt <i>in vitro</i> expandierten CD45RA ⁻ Treg	Anteil FOXP3 ⁻ Zytokin ⁺ Zellen an den gesamt <i>in vitro</i> expandierten CD45RA ⁻ Treg	Zytokin ⁺ Zellen in gesamt <i>in vitro</i> expandierten CD45RA ⁻ Treg
IFNγ ⁺ (MW±SD), (n=10)	3,1%±2,0%	6,5%±3,6%	9,6%±4,0%
IL-4 ⁺ (MW±SD), (n=16)	3,4%±1,9%	29,9%±17,3%	33,3%±17,4%
IL-13 ⁺ (MW±SD), (n=16)	3,3%±2,3%	29,0%±22,0%	32,4%±22,1%
IL-17 ⁺ (MW±SD), (n=17)	4,3%±2,6%	2,8%±1,7%	7,1%±3,5%

Zur weiteren Charakterisierung der untersuchten Zellpopulationen wurden diese auf das Vorkommen von Zytokindoppelproduzenten untersucht. Durch gleichzeitige Färbung mehrerer linienspezifischer Zytokine wurde deutlich, dass unter *in vitro* expandierten CD45RA⁻ Treg, ähnlich wie in nicht expandierten CD4⁺ T-Zellen aus dem peripheren Blut (Kapitel 4.1.3), eine Population von IL-4⁺IL13⁺, IL-4⁺IFNγ⁺ sowie IL-13⁺IFNγ⁺ Doppelproduzenten existiert. IL-4 und IL-17 wurden, wie IL-17 und IFNγ, dagegen nur vereinzelt (<1,5%) koexprimiert (Tabelle 22 und Abbildung 22).

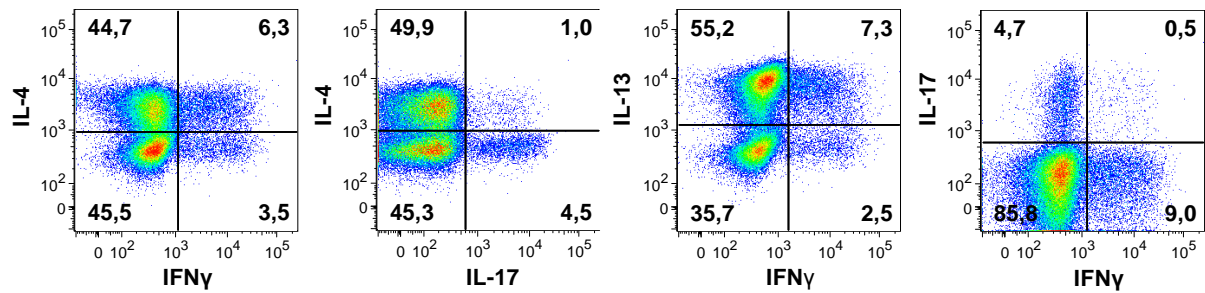


Abbildung 22: Darstellung simultaner Zytokinexpressionen in in vitro expandierten CD45RA⁺ Treg

CD45RA⁺ Treg wurden *in vitro* expandiert und mit PMA/Ionomycin in Gegenwart von GolgiStop stimuliert. Dargestellt ist die simultane Expression mehrerer Zytokine in CD4⁺ Zellen. Die Abbildung ist für n=3 Spender repräsentativ. Die Daten aller Messungen sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 22: Zytokindoppelproduzenten in in vitro expandierten CD45RA⁺ Treg

	IL-4 ⁺ IFNγ ⁺ (n=6)	IL-4 ⁺ IL-17 ⁺ (n=4)	IL-13 ⁺ IFNγ ⁺ (n=6)	IL-17 ⁺ IFNγ ⁺ (n=3)	IL-4 ⁺ IL-13 ⁺ (n=3)
MW± SD	3,4%±3,0%,	0,5%±0,2%	3,8%±3,1%	0,7%±0,2%	14,6%±11,3%

Im Folgenden sollte, soweit möglich, durchflusszytometrisch die Expression von GATA3 und T-bet in *in vitro* expandierten CD45RA⁺ Treg in Abhängigkeit von FOXP3 bestimmt werden, um die Daten anschließend mit den Ergebnissen aus den Transkriptomanalysen vergleichen zu können. Im ersten Teil der Arbeit (Kapitel 4.1) zeigte sich die FACS-Färbung mit dem Antikörper gegen GATA3 als geeignet, um nach vorangehender PMA/Ionomycin Stimulation Th2 differenzierte Zellen zu erkennen. T-bet zeigte im Gegensatz hierzu allenfalls eine tendenziell höhere Expression in IFNγ-Produzenten verglichen mit IL13-Produzenten, jedoch keinen Unterschied zwischen IFNγ-Produzenten und IL-17-Produzenten. Der Antikörper gegen RORγ(t) erwies sich zur alleinigen Identifizierung von Th17 Zellen als gänzlich ungeeignet. Somit sollten im Folgenden durchflusszytometrisch die Expressionen von GATA3 (auch in Abhängigkeit von der Expression von IL-13, IFNγ und IL-17) sowie T-bet (in Abhängigkeit von der Expression von IL13 und IFNγ) in *in vitro* expandierten CD45RA⁺ Treg untersucht werden.

Bereits auf Transkriptomebene ließ sich kein signifikanter Unterschied in den Expressionsleveln von Tbx21 zwischen FOXP3-stabilen bzw. instabilen *in vitro* expandierten CD45RA⁺ Treg feststellen und auch durchflusszytometrisch zeigte sich in beiden Populationen eine homogene T-bet Expression (Abbildung 23A). Genauso wie in Zellen des peripheren Blutes (Kapitel 4.1.3), trat auch in *in vitro* expandierten CD45RA⁺ Treg keine signifikant höhere T-bet Expression in IFNγ⁺ Zellen, verglichen mit IL-13⁺ Zellen auf (MFI T-bet in IFNγ- vs. IL-13-Produzenten, p=0,17, n=3 Spender, ungepaarter 2-seitiger T-Test, Abbildung 23B).

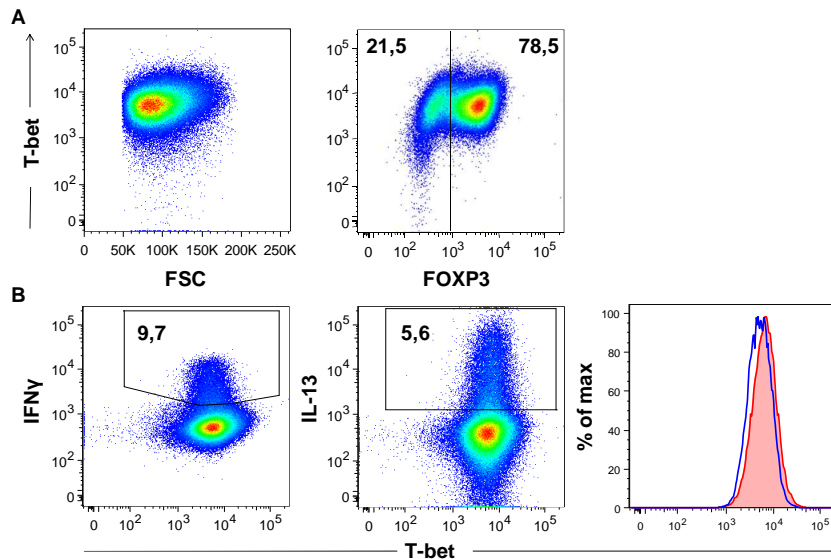


Abbildung 23: T-bet Expression in *in vitro* expandierten CD45RA⁻ Treg in Abhängigkeit von FOXP3 bzw. der IL-13 und IFN γ Produktion

CD45RA⁻ Treg wurden *in vitro* expandiert und mit PMA/Ionomycin in Gegenwart von GolgiStop stimuliert. Dargestellt sind CD4⁺ Zellen. (A) zeigt die T-bet Expression auch in Abhängigkeit von der FOXP3-Expression. (B) stellt die T-bet Expression in IFN γ - bzw. IL-13-Produzenten dar. Die Histogramme und Dotplots sind für n=4 (A) und n=3 (B) Spender repräsentativ.

IFN γ -Produzenten ■, IL-13-Produzenten ■

Als nächstes wurden *in vitro* expandierte CD45RA⁻ Treg durchflusszytometrisch hinsichtlich ihrer Expression von GATA3 untersucht.

In den Arraydaten zeigte sich in FOXP3-stabilen Zellen eine signifikant niedrigere GATA3-Expression verglichen mit FOXP3-instabilen Zellen, durchflusszytometrisch erschien der Großteil der Zellen hingegen homogen für GATA3 (Abbildung 24). Zudem fiel unter den FOXP3⁻ Zellen eine Aufteilung der Zellen in eine GATA3^{high} und eine GATA3^{low} Fraktion auf (Abbildung 24, rechter Plot). Im Bezug auf die FOXP3⁻ Zellen waren die Ergebnisse der Durchflusszytometrie somit gut mit den Ergebnissen aus den Genexpressionsarrays vereinbar. Für die homogene GATA3 Expression in der FACS-Färbung unter FOXP3⁺ Zellen könnte es mehrere Erklärungen geben.

Eine Erklärung hierfür könnte der Umstand sein, dass bei den Microarrays mRNA-Levels betrachtet wurden, wohingegen mittels FACS das vorhandene Protein detektiert wird. Möglicherweise war der auf Genexpressionsebene gemessene Unterschied (lineare Skala) nicht ausgeprägt genug um ihn auf Proteinebene durchflusszytometrisch (logarithmische Skala) verifizieren zu können. Eine weitere Beeinflussung der durchflusszytometrischen Ergebnisse ist durch den generellen Anstieg des GATA3 Expressionslevels während der Stimulation der Zellen zu erklären (die Transkriptomanalysen wurden mit RNA aus unstimulierten Zellen durchgeführt). Eine durchflusszytometrische Messung der GATA3 Expression ohne vorangehende Stimulation der Zellen hatte sich jedoch schon in den vorangehenden Versuchen als nicht zielführend erwiesen (Kapitel 4.1.1), da vermutlich auch

in nicht stimulierten Zellen die Expressionsunterschiede zwischen den Populationen (wenn vorhanden) nicht ausreichend sind, um sie mittels FACS zu detektieren. Somit stehen die hier erhaltenen durchflusszytometrischen Ergebnisse nicht im Widerspruch zu den Microarraydaten, sondern zeigen vielmehr die Grenzen der FACS-basierten Untersuchungsmöglichkeiten auf und unterstreichen hierdurch die Wichtigkeit der neu etablierten Färbemethode.

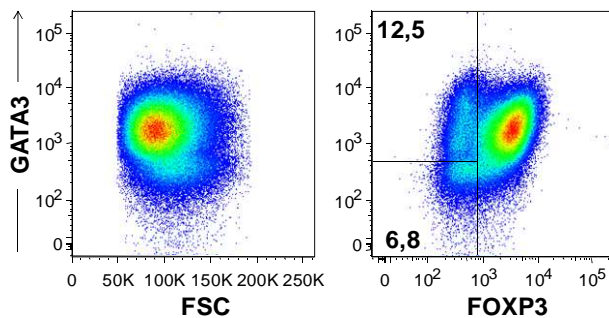


Abbildung 24: GATA3 Expression in in vitro expandierten CD45RA⁻ Treg

CD45RA⁻ Treg wurden in vitro expandiert und mit PMA/Ionomycin in Gegenwart von GolgiStop stimuliert. Dargestellt sind CD4⁺ Zellen. Gezeigt ist die GATA3 Expression in CD45RA⁻ Treg auch in Abhängigkeit von der FOXP3-Expression. Die Dotplots sind für n=4 Spender repräsentativ.

Betrachtet man im Speziellen die zytokinproduzierenden Zellen unter den in vitro expandierten CD45RA⁻ Treg, so exprimierten die IL-4-produzierenden Zellen GATA3 signifikant höher als IFN γ - oder IL-17-Produzenten ($p=0,0047$; $p<0,05$ für IL-4- vs. IFN γ -Produzenten, $n=6$; $p<0,01$ für IL-4- vs. IL-17-Produzenten, $n=5$; ungepaarter 2-seitiger T-Test, Abbildung 25 und [154]). Somit konnte durchflusszytometrisch die Korrelation zwischen der Expression von Th2 Zytokinen und der Höhe des GATA3 Expressionslevels, welcher sich schon auf Transkriptomebene andeutete, bestätigt werden.

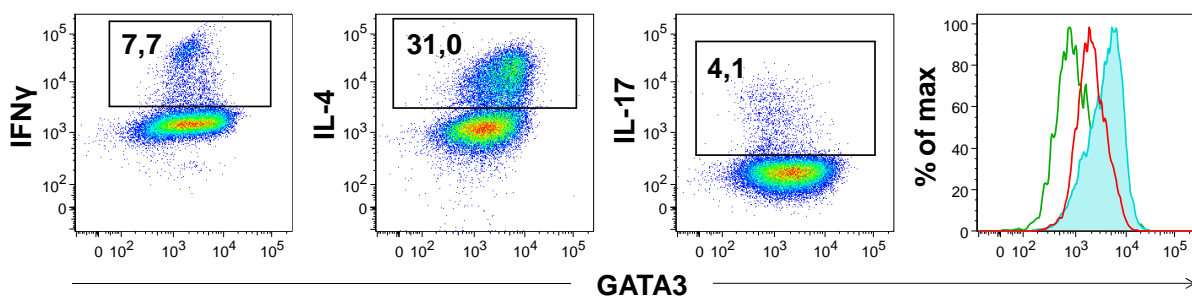


Abbildung 25: GATA3 Expression in IFN γ -, IL-4- bzw. IL-17-positiven in vitro expandierten CD45RA⁻ Treg

CD45RA⁻ Treg wurden in vitro expandiert und anschließend mit PMA/Ionomycin in Gegenwart von GolgiStop stimuliert. Die Dotplots zeigen CD4⁺ Zellen und zeigen die Koexpression von GATA3 und IFN γ , IL-4 bzw. IL-17. Im Histogramm sind die jeweils unterschiedlichen Expressionshöhen von GATA3 im Vergleich dargestellt. Die Abbildung ist repräsentativ für n=5 Spender. Modifiziert nach [154].

IFN γ -Produzenten ■, IL-4-Produzenten ■, IL-17-Produzenten ■

FOXP3⁻ in vitro expandierte CD45RA⁻ Treg produzierten in hohen Mengen die Th2 Zytokine IL-4 und IL-13. IFN γ und IL-17 hingegen wurden nur in geringen Mengen und weitgehend unabhängig von der FOXP3-Expression exprimiert. Dies zeigt sich sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene (Abbildung 21). Durchflusszytometrisch war zudem festzuhalten, dass die Produzenten der Th2 Zytokine GATA3 signifikant höher exprimieren als Th1 bzw.

Th17 Zytokinproduzenten. Somit konnte in den durchflusszytometrischen Untersuchungen verifiziert werden, dass FOXP3-instabile Treg nach *in vitro* Expansion nicht nur auf Transkriptionsebene, sondern auch phänotypisch eine Entwicklung zu Th2 Zellen vornehmen. Durch die breite Stimmigkeit der Ergebnisse aus den FACS-Färbungen und den Transkriptomanalysen konnte zudem die Anwendbarkeit der neu entwickelten Färbemethode bestätigt werden.

5 Diskussion

5.1 FOXP3, T-bet, GATA3 und ROR γ (t) Antikörper für durchflusszytometrische Analysen

In der vorliegenden Arbeit sollte, u.a. mittels FACS Analysen, untersucht werden, ob in *in vitro* expandierten FOXP3-instabilen Treg, nach Verlust von FOXP3, der Nachweis der Expression anderer linienspezifischer TF möglich ist. Daher wurde zunächst geprüft, ob durchflusszytometrisch der Nachweis einer unterschiedlichen Expression von sogenannten „linienspezifischen“ TF (T-bet, GATA3, ROR γ (t)) in frisch isolierten bzw. *in vitro* stimulierten humanen PBMC gelingt und ob diese Expression „linienspezifischer“ TF mit der entsprechenden Zytokinexpression korreliert.

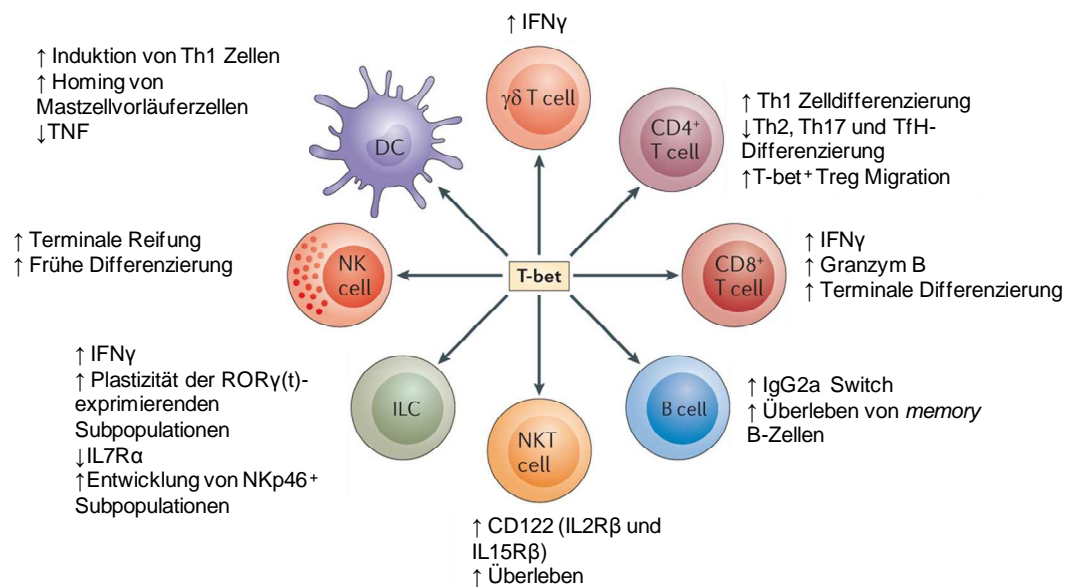


Abbildung 26: T-bet Expression und Funktion in ausgewählten Zelltypen des Immunsystems

T-bet ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems. T-bet wird insbesondere in NK-Zellen und NKT-Zellen exprimiert, aber auch in Zellen des adaptiven Immunsystems. Hier sei besonders auf die Funktion und Expression in CD4⁺, CD8⁺ und B-Zellen hingewiesen. Abbildung modifiziert nach [155].

T-bet wurde zunächst nur Bedeutung in der Entwicklung und Funktion von Th1 Zellen zugeschrieben. Inzwischen ist jedoch bekannt, dass der Transkriptionsfaktor multiple Differenzierungswege beeinflusst sowie die Entwicklung und Effektorfunktion von zahlreichen weiteren Immunzellen steuert (Abbildung 26) [155].

In unstimulierten PBMC zeigte sich keine selektive Färbung von T-bet positiven und negativen Populationen unter den CD4⁺ T-Zellen. 2014 veröffentlichten Knox et al., dass in den einzelnen Subpopulationen dann eine Differenzierung in T-bet^{low} und T-bet^{high} exprimierende Subgruppen möglich ist, wenn anhand von Mehrfachfärbungen mittels CD27, CD45RO und CCR7 in einzelne Differenzierungsgruppen aufgeteilt wird (T-Effektorzellen T_E

CD27⁺CD45RO⁺CCR7⁻, T-Effektor *memory* Zellen T_{EM} CD27⁺CD45RO⁺CCR7⁻ und T *central memory* Zellen T_{CM} CD27⁺CD45RO⁺CCR7⁺). Je effektortypischer die Zellen wurden, desto mehr T-bet^{high} Zellen tauchten in den einzelnen Subgruppen auf. So zeigten sich bei T_E bis 20% der Zellen und in T_{EM} ca. 10-20% der Zellen T-bet^{high} [156]. Die Arbeit dieser Forschergruppe zeigte jedoch nicht, ob diese T-bet^{high} Zellen im Bezug auf ihre Zytokinexpression den Th1 Zellen entsprechen. Des Weiteren ist festzuhalten, dass eine Differenzierungsmöglichkeit von drei T-bet unterschiedlich hoch exprimierenden Subgruppen unter gesamt CD4⁺ Zellen (ohne aufwendige Mehrfachfärbungen) durch den Antikörper nicht gegeben ist.

Es zeigte sich auch ein (sehr variabler) Anteil der CD8⁺ T-Zellen T-bet⁺. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass T-bet für die Differenzierung von CD8⁺ *memory* T-Zellen unerlässlich ist [149]. Die stark schwankenden Populationsgrößen könnten daher ein Ausdruck des unterschiedlich hohen Anteils von *memory* Zellen unter den zytotoxischen T-Zellen in den unterschiedlichen Spendern zum Zeitpunkt der Blutabnahme sein. Die Daten entsprechen außerdem einer durchflusszytometrischen Untersuchung der Arbeitsgruppe um Knox, welche postulierten, dass der Transkriptionsfaktor T-bet mit dem Grad der Differenzierung der CD8⁺ Zellen korreliert und essentiell für die Funktion von Effektor- und Effektor *memory* CD8⁺ Zellen ist [156]. In Mäusen zeigte sich *in vivo* unter antigenspezifischer Stimulation die Notwendigkeit von T-bet für die Entstehung zytotoxischen Effektorzellen aus naiven CD8⁺ Zellen. In den entsprechenden T-bet *knock-out* Mäusen entstanden Effektorzellen mit abgeschwächter zytotoxischer Aktivität sowie einem veränderten Zytokinexpressionsprofil [149].

Unter den B-Zellen zeigte sich in der vorliegenden Arbeit reproduzierbar eine kleine Population T-bet⁺ Zellen. Wang et al. publizierten 2012, dass T-bet über die Aktivierung von STAT-1 die Expression von IgG2a-haltigen B-Zellrezeptoren bewirkt sowie das Überleben von *memory* B-Zellen dieser IgG-Subklasse unterstützt [150]. Bei dem von uns beobachteten Anteil T-bet⁺ Zellen innerhalb des B-Zellkompartimentes könnte es sich folgerichtig um IgG2a-exprimierende Zellen handeln.

NK-Zellen (CD56⁺CD3⁻) waren fast ausschließlich T-bet⁺ (98%, Abbildung 5B) und ihre T-bet Expression homogen deutlich höher als die anderer PBMC. Die Entwicklung unreifer NK Zellen (TRAIL⁺) hin zu reifen NK Zellen (TRAIL⁻) ist abhängig von der T-bet Expression, aber auch darüber hinaus deuteten sich weitere Funktionen von T-bet in NK Zellen an. Die Wichtigkeit von T-bet für NK Zellen zeigte sich insbesondere dadurch, dass, wie beschrieben, T-bet *knock-out* Mäuse keine NK-Zellen entwickeln können [151].

Auch innerhalb der CD3⁺CD56⁺ NKT-Zellen fand sich reproduzierbar ein gewisser Anteil an T-bet⁺ Zellen, welche sich größtenteils ebenfalls CD8⁺ zeigten. Dabei handelt es sich am

wahrscheinlichsten um aktivierte CD8⁺ Zellen, welche als Folge CD56 und vermutlich ebenfalls im Rahmen der Stimulation T-bet hochregulieren.

Der Transkriptionsfaktor GATA3 wurde erstmals 1991 isoliert [157] und seine Wichtigkeit und tragende Rolle in der Th2 Zellentwicklung beschrieben. Inzwischen weiß man, dass dessen Aufgaben jedoch weit über die Th2 Zellentwicklung und Funktion hinausgehen.

Eindeutig GATA3 positive oder negative Populationen ließen sich unter den frisch isolierten T-Zellen nicht identifizieren. Es wird vermutet, dass auch CD8⁺ Tc2 Zellen, wie Th2 Zellen, für ihre Differenzierung GATA3 benötigen. Tc2 Zellen sind zytotoxische T-Zellen, welche an einer Immunantwort teilnehmen, die durch Th2 Zellen gesteuert wird [158]. In T-Zellen zeigt sich zwar, gerade im Vergleich zu B-Zellen, in den durchgeführten Versuchen eine höhere GATA3 Expression, eindeutig GATA3⁺ Zellen lassen sich jedoch, sowohl unter den zytotoxischen T-Zellen, wie auch unter den CD4⁺ T-Helferzellen, nicht detektieren. Möglicherweise sind sowohl in Th2 als auch in Tc2 Zellen die Expressionsunterschiede verglichen mit den anderen Subpopulationen zu gering, um sie mit den verwendeten Messmethoden in unstimulierten gesamt CD8⁺/CD4⁺ Zellen festzustellen. Eine zweite Möglichkeit wäre, dass es in PBMC von Normalpersonen kaum Th2/Tc2 Zellen gibt.

Während in B-Zellen durchflusszytometrisch keine GATA3-Expression nachgewiesen werden konnten, war innerhalb der NK-Zellen eine GATA3⁺ Subpopulation zu erkennen. Beide Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen zur GATA3 Expression auf mRNA-Ebene in den besagten Lymphozytenpopulationen überein [153, 157]. Die Ergebnisse zeigten, dass unter NKT-Zellen sowohl GATA3^{low} und GATA3⁻ Zellen zu finden sind; diese beiden Gruppen waren jedoch nicht scharf voneinander differenzierbar. Insbesondere im Vergleich zu GATA3⁻ B-Zellen zeigte sich aber, dass ein Teil der NKT-Zellen (44,2%, Abbildung 6B) GATA3 zumindest niedrig exprimieren. GATA3 ist sowohl in der thymischen Entwicklung als auch in der Peripherie für das Überleben und die Reifung von CD4⁺CD8⁻ bzw. CD4⁻CD8⁻ iNKT-Zellen essentiell (invariante NKT-Zellen, auch als Typ I NKT-Zellen oder CD1d-abhängige NKT-Zellen bezeichnet, exprimieren die invariante TCR α -Kette) und in der Maus zeigte sich, dass GATA3-Mangel zu einer fehlerhaften Reifung von murinen iNKT sowohl im Thymus als auch im peripheren Blut führt [159]. Somit lässt sich eine, wenn auch niedrige, GATA3 Expression in NKT-Zellen durchaus mit den Angaben in der Literatur vereinen.

Neben GATA3, T-bet und FOXP3 wurde auch der Antikörper gegen ROR γ (t) getestet. Hier zeigte sich in einigen Messungen zwar eine gering höhere Expression von ROR γ (t) in Subpopulationen von PBMC, diese ließ sich jedoch nur schwer von der restlichen homogenen ROR γ (t)-Expression abgrenzen und die Ergebnisse waren in wiederholten Experimenten inkonstant. Das intermediäre Bindungsmuster des Antikörpers legt zunächst

die Möglichkeit einer unspezifischen Antikörperbindung nahe. Zum Blockieren unspezifischer Bindungen wurde vor der intranukleären Färbung jedoch nach dem FOXP3-Färbeprotokoll der Firma eBioscience Rattenserum verwendet. Der verwendete Antikörper ROR γ (t) stammt ebenfalls aus der Ratte. Eine mögliche Beeinflussung der Färbungen durch unspezifische Bindungen sollte daher unwahrscheinlich sein. Die Definition von ROR γ (t) als Transkriptionsfaktor für Th17 stammt aus der Maus und RNA Daten am Menschen, eine geeignete Unterscheidung von Th17 Zellen anhand der ROR γ (t)-Expressionshöhe auf Proteinebene ist dadurch nicht zwangsläufig gegeben. Da jedoch Daten aus Western Blot Versuchen existieren, scheint der ROR γ (t) Antikörper lediglich für die FACS Analyse ungeeignet.

Somit war in unstimulierten Zellen ausschließlich anti-FOXP3 gut zur Charakterisierung der entsprechenden regulatorischen T-Zellen geeignet. Innerhalb der unstimulierten T-Helferzellen gestaltete sich der Nachweis von GATA3, T-bet und ROR γ (t) uneindeutig und schwierig. Mögliche Gründe sind, dass die Unterschiede in der Expression dieser TF unter den unstimulierten CD4⁺ T-Zellsubpopulationen nicht groß genug sind, um sie mittels einer FACS-Analyse in logarithmischer Auftragung zu detektieren oder aber, dass im peripheren Blut von Normalpersonen kaum differenzierte Subpopulationen von T-Helferzellen auftreten. Dies wird unter anderem dadurch gestützt, dass in weiteren Versuchen unserer Arbeitsgruppe in unstimulierten humanen PBMC für die untersuchten Transkriptionsfaktoren auch kaum mRNA nachweisbar war (Daten nicht abgebildet). Da T-Lymphozyten oftmals erst nach Stimulation (TCR abhängig oder unabhängig) Zytokine synthetisieren, wurde die Expression von T-bet, GATA3 und ROR γ (t) im Folgenden daher nach *in-vitro* Stimulation mit PMA/Ionomycin erst alleine und dann mit entsprechenden linienspezifischen Zytokinen untersucht.

Im Gegensatz zur Färbung von unstimulierten PBMC, ließ sich nach Stimulation eine deutliche Population GATA3⁺ Zellen sowohl unter den CD4⁺, als auch unter den CD4⁻ T-Zellen abgrenzen. Verglichen mit den Färbeergebnissen aus den unstimulierten PBMC scheint GATA3 somit nur in stimulierten CD4⁺ T-Zellen auf einem so hohen Level exprimiert zu werden, dass ein deutlich messbarer Unterschied zu GATA3 nicht exprimierenden CD4⁺ T-Zellen entsteht. Inwieweit die GATA3⁺CD4⁺ Population auch die Gruppe der Th2 differenzierten T-Zellen oder nur eine unspezifisch höhere Expression an GATA3 in einigen CD4⁺ Zellen anzeigt (als Effekt der vorangegangenen Stimulation), musste in den folgenden Versuchen noch geklärt werden. Im Gegensatz dazu konnten auch nach PMA/Ionomycin Stimulation keine sicher T-bet bzw. ROR γ (t) positiven und negativen Populationen innerhalb der Gesamt CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. T-bet⁺ Zellen waren jedoch, wie in unstimulierten PBMC, ebenfalls wieder unter den CD4⁻ Zellen zu beobachten. Die Färbungen

mit dem Antikörper gegen ROR γ (t) lieferten auch an stimulierten PBMC weder in CD4⁺ noch in CD4⁻ Zellen eindeutig abgrenzbare Populationen.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Produktion von zelltypspezifischen Zytokinen mit der Expression der entsprechenden Transkriptionsfaktoren positiv korreliert und somit auch, ob die Färbungen mit den entsprechenden Antikörpern für die Identifizierung der entsprechenden T-Zellsubpopulationen geeignet sind. Hierzu wurden mittels MACS angereicherte CD4⁺ PBMC mit PMA/Ionomycin stimuliert und anschließend intrazellulär auf klassische liniendefinierende Zytokine (IFN γ , IL-4 und IL-13, IL-17) und gleichzeitig intranukleär auf den entsprechenden TF (T-bet, GATA3, ROR γ (t)) gefärbt.

Obwohl kein signifikanter Unterschied zwischen der T-bet Expression in IFN γ -Produzenten im Vergleich mit anderen Zytokinproduzenten gesehen wurde, zeigte sich eine tendenziell höhere T-bet Expression in IFN γ -produzierenden Zellen. Die gleichzeitige Färbung weiterer Th1-liniendefinierender Zytokine könnte zu deutlichen Unterschieden führen, um so Th1 Zellen von anderen Zellen, welche IFN γ aufgrund der vorangegangenen Stimulation produzieren oder Zellen mit gemischtem Expressionsmuster (IFN γ und gleichzeitige Expression von Zytokinen anderer T-Helferzelllinien), unterscheidbar zu machen. Interessant wären auch die Ergebnisse einer Zellsortierung von T_E/T_{EM} Zellen, welche nach PMA/Ionomycin Stimulation simultan auf T-bet und Zytokine gefärbt werden. So könnte sich möglicherweise der Trend zur höheren T-bet Expression in Th1 Zytokinproduzenten zu einem signifikanten Unterschied im Vergleich zu anderen T-Helferzellsubpopulationen abgrenzen. Ebenfalls drängt sich die Frage auf, ob eine längere oder TCR-abhängige Stimulationsart eventuell deutliche Unterschiede aufgezeigt hätte.

GATA3 wurde in Th2-Zytokinproduzenten signifikant höher exprimiert als in Zellen mit IFN γ oder IL-17 Produktion. Insbesondere fiel bei gleichzeitiger Betrachtung von zwei Zytokinen auf, dass reine Th1/Th17 Zellen kein GATA3 exprimierten, wohingegen „Mischzellen“ (welche Zytokine verschiedener Th-Linien produzierten) zwar einen Anteil GATA3⁺ Zellen hatten, dieser jedoch geringer war als der Anteil GATA3⁺ Zellen mit „reinem“ Th2-Zytokinprofil. In Übereinstimmung mit der Literatur scheint die GATA3 Expression eine wichtige Voraussetzung für die Produktion von Th2 Zytokinen zu sein, welche wiederum Ausdruck für eine Differenzierung der Zelle in diese Richtung ist. Folgerichtig wurden im peripheren Blut bereits vorhandene Th2 Zellen, bzw. Zellen welche mehr oder weniger Richtung Th2 differenziert waren, durch die *in vitro* Stimulation soweit aktiviert, dass diese ihre GATA3 Expression und folglich auch Th2-Zytokinproduktion erhöhten. Mischzellen produzierten (zumindest vorübergehend) Zytokine mehrerer T-Helferzelllinien, was ebenfalls in der Literatur beschrieben ist [103, 104, 160]. Zudem weisen die Daten aus Tabelle 18 darauf hin, dass die Produktion von Th2 Zytokinen auch in GATA3⁻ Zellen stattfinden kann,

was durchaus Folge der TCR-unabhängigen Stimulationsart sein kann. In den Versuchen zeigten sich jedoch auch GATA3⁺ Zellen, welche keine der gemessenen Zytokine produzierten. Es ist bekannt, dass differenzierte T-Helferzellen nicht zu allen Zeitpunkten nach einer Stimulation gleichmäßig hoch alle liniendefinierenden Zytokine produzieren [161]. Differenzierte Th2 Zellen, welche Zytokine produzieren, und jene, welche (bestimmte) Zytokine nicht produzieren, weisen hierbei auch Unterschiede auf genetischer Ebene auf, werden aber trotzdem beide den Th2 Zellen zugeordnet [162]. Somit stellt sich die Frage, ob GATA3 ein besserer Marker zur Identifikation von Th2 Zellen ist (Zytokin produzierend oder nicht produzierend), als die alleinige Messung der produzierten Zytokine. Die getestete GATA3-Färbung scheint nach den vorliegenden Ergebnissen eine gute Möglichkeit zu sein, Th2 Zellen nach PMA/Ionomycin Stimulation zu identifizieren. Insbesondere wäre es möglich, auch jene Th2 Zellen zu detektieren, welche zum Messzeitpunkt keine (bzw. die nicht gemessenen) Zytokine exprimieren. Dies bedürfte jedoch einer weiteren Untersuchung, welche hier durch die neu entwickelte Färbemethode in Zukunft durchführbar erscheint.

RORγ(t) zeigte weder in stimulierten noch in unstimulierten PBMC eindeutig abgrenzbare Populationen. Die RORγ(t)-Expression in IL-17-Produzenten zeigte zwar einen Trend, war statistisch aber nicht signifikant höher gegenüber der anderer Zytokinproduzenten. Bei PMA/Ionomycin stimulierten Zellen ist die Expressionshöhe der messbaren Antigene/Zytokine extrem zeitabhängig [161]. Trotz des zum Messzeitpunkt vorhandenen IL-17 wäre vielleicht zu einem anderen Zeitpunkt eine erhöhte RORγ(t)-Expression detektierbar. Möglicherweise erfolgten die Messungen für eine erfolgreiche Detektion RORγ(t)⁺ Zellen in PBMC zu spät oder zu früh im Abstand zur Stimulation. Zudem könnte eine alternative Stimulationsmethode zu signifikanten Ergebnissen führen, da möglicherweise die hier verwendeten Bedingungen eine transiente IL-2-induzierte Inhibierung der IL-17- und RORγ(t)-Expression via STAT5 bewirkt haben könnten [108]. Da der Antikörper gegen humanes RORγ(t) jedoch bis dato schon längere Zeit erhältlich ist und in der Literatur keine reproduzierbaren Färbungen RORγ(t)⁺ humaner Th17 Zellen zu finden sind, wird davon ausgegangen, dass der Antikörper gegen RORγ(t) für die FACS-Färbung nicht geeignet ist.

Die Ergebnisse bestätigten insgesamt, dass nur der erhältliche Antikörper gegen FOXP3 für eine Separation von Treg auch aus unstimulierten PBMC geeignet ist, der Antikörper gegen GATA3 ist für die Identifizierung von Th2 Zellen in stimulierten Zellen geeignet. Für die Integrität von Treg ist eine konstant hohe Expression von FOXP3 unerlässlich, wohingegen dies so für die einzelnen Th-Zelltypen nicht zu gelten scheint. Dies liegt möglicherweise auch daran, dass die Differenzierungsformen, welche man durch mehrere Restimulationen *in vitro*

erhält, in dieser Form und Reinheit unter physiologischen Bedingungen in gesunden Normalpersonen nicht oder nur selten vorkommen.

5.2 RNA aus intranukleär gefärbten und FACS-gesorteten Zellen

Das nächste Ziel war es, ein Färbeprotokoll zu entwickeln, welches es ermöglicht mRNA für nachfolgende molekularbiologische Analysen aus Zellen, die primär über intranukleäre Marker definiert werden (wie beispielsweise Treg) zu gewinnen. Zwar gibt es kommerziell erhältliche Kits zur Isolation von RNA aus fixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben, die mit diesen Methoden erhaltene RNA ist jedoch qualitativ nicht hochwertig (starke Degradation) und ermöglicht bestenfalls quantitative RT-PCR Analysen bestimmter Gene [163]. Alle momentan kommerziell erhältlichen Färbekits zur intranukleären FOXP3-Färbung für die Durchflusszytometrie enthalten Paraformaldehyd (PFA), welches Quervernetzungen in der RNA sowie zwischen Nukleinsäuren und anderen Zellbestandteilen (z.B. Proteinen) herstellt und so eine anschließende Isolation intakter RNA unmöglich macht. Daher musste eine alternative Färbemethode entwickelt werden, welche einerseits eine akzeptable Färbung der Zellen zulässt, andererseits aber auch eine ausreichende Integrität anschließend isolierter mRNA garantiert.

Ethanol (EtOH) und Methanol entfalten ihre zellfixierende Wirkung vor allem durch die Verdrängung der intrazellulären Flüssigkeit und nicht durch die Induktion von Quervernetzungen und wurden somit als alternative Fixierungsmittel in Betracht gezogen. Zudem wird Ethanol zur RNA-Präzipitation bei nahezu jeder RNA-Isolationsmethode verwendet, eine RNA Extraktion nach einer Zellfärbung unter Anwendung von Ethanol sollte somit möglich sein. Folglich blieb die Frage, ob eine verwertbare Färbung der erwünschten Antikörper unter Verwendung von Ethanol bzw. Methanol möglich ist. Es zeigte sich, dass beide Alkohole in 70%iger Konzentration für die getesteten Antikörper gute Färbeergebnisse lieferten. Für die weiteren Versuche wurde daher das weniger toxische Ethanol verwendet. Bei diesen ersten Färbungen wurde als Puffer der für die meisten herkömmlichen Färbeprotokolle verwendete FACS-Puffer (PBS/2% FCS) bzw. pures PBS verwendet. So wurde sichergestellt, dass mögliche schlechte Färbeergebnisse nicht aufgrund des verwendeten Puffers zustande kamen. Erste RNA-Isolationsversuche nach Färbung in Ethanol mit den beiden verwendeten Puffersubstanzen zeigten jedoch lediglich degradierte RNA. Da Ethanol als Bestandteil vieler RNA-Isolationsmethoden nicht der Grund für die RNA-Degradation sein konnte, musste folglich nach einem alternativen Färbepuffer gesucht werden. Da die Verwendung von purem PBS ebenfalls in einer degradierten RNA resultierte, dieses jedoch sicherlich keine RNasen aufweist (und auch die, zur Sicherheit trotzdem durchgeführte, DEPC Behandlung keine besseren Ergebnisse lieferte), schien eine Modifizierung des Puffers nötig, welche eine RNA-Stabilisierung bewirkt. Getestet wurden

verschiedene proteinhaltige Zusätze zu PBS (FCS, HA, Trypton) in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen. Die zugesetzten Proteine sollten dabei der Stabilisierung der RNA dienen. Um eine Degradation der RNA durch möglicherweise in den Proteinlösungen ebenfalls enthaltenen RNasen zu verhindern, wurde ein RNase-Inhibitor hinzugegeben und alle erhaltenen Lösungen soweit möglich DEPC versetzt. Zudem wurden zur Extraktion der RNA jeweils zwei unterschiedliche Methoden verwendet (eine Phasenseparationstechnik mittels TRIzol der Firma Invitrogen und eine säulenbasierte Technik der Firma Qiagen), um die Wahrscheinlichkeit einer negativen Beeinflussung der Ergebnisse durch eine inkompatible Extraktionsmethode zu minimieren. Trotz aller Maßnahmen zeigte sich lediglich der Zusatz von Trypton wirksam, um intakte RNA isolieren zu können. Gute Ergebnisse ließen sich bis zu einer minimalen Tryptonkonzentrationen von 2% erzielen. Dies ist gut durch einen möglicherweise entstandenen Schutz der RNA durch das enthaltene Trypton zu erklären. Dieser wäre z.B. durch Anlagerung von Proteinen an die RNA möglich, die diese zum einen stabilisieren und zum anderen für RNasen schwerer angreifbar machen könnten. Inwieweit der durch Trypton entstehende pH-Wert des Puffers (ca. 6,5) für die positiven Ergebnisse ausschlaggebend war, müssen weitere Versuche zeigen. Anschließend wurden wieder FACS-Färbungen durchgeführt, bei denen sich schnell herausstellte, dass Trypton die Färbequalität zwar negativ beeinflusst, sich aber bei einer maximalen Konzentration von 2% Trypton im Färbepuffer noch verwertbare Ergebnisse erzielen ließen. Parallel wurden für die FOXP3-Färbung Antikörper mit verschiedenen Fluorochromen ausgetestet. Der Allophycocyanin-markierte FOXP3 Antikörper erwies sich hierbei als am Besten geeignet. Eine Markierung mit PE bzw. PE-Cy7 konnte nach Ethanolfixierung und Färbung in Tryptonpuffer nicht überzeugen (Daten nicht abgebildet). Trypton beeinflusst denkbarerweise die Struktur der Fluorochrome und maskiert diese. Nach der ersten Analyse der RNA am Spektrophotometer wurde deren Integrität ergänzend durch RNA-Gelelektrophorese bzw. den Bioanalyzer getestet und bestätigt.

Abschließend zeigte sich somit, dass Trypton als autoklavierbarer Proteinersatz in den Färbepuffern (PBS/2% Trypton) und 70% Ethanol als Fixierungsreagenz benutzt werden kann; die mit diesen Reagenzien durchgeführten FOXP3-Färbung *in vitro* expandierter Treg zeigten mit der Referenzmethode (eBioscience) vergleichbar gute Färbeergebnisse in Bezug auf die CD4 (FITC-markiert)- und FOXP3 (Allophycocyanin-markiert)-Färbungen. Die somit in den Microarrayexperimenten erhaltenen Daten waren in mehreren Experimenten reproduzierbar und die detektierten Unterschiede in sich schlüssig (z.B. hohe Expression von FOXP3 in FOXP3⁺ sortierten Populationen, Hochregulation von Th2 Zytokinen zusammen mit Th2 „spezifischen“ Transkriptionsfaktoren). Dennoch erfordern mittels Microarray gewonnene Erkenntnisse, vor allem nach Modifikation der FOXP3-Färbemethode, die Bestätigung der Ergebnisse mit mindestens einer komplementären Methode. Hier wurde als

Methode zur Verifizierung der Ergebnisse die Durchflusszytometrie gewählt. Diese verifizierte die mittels Microarray gewonnenen Erkenntnisse und bestätigte somit auch die Qualität der nach der modifizierten FOXP3-Färbung gewonnenen RNA.

Die hier entwickelte FOXP3-Färbetechnik erlaubte eine für FACS-Sortierung ausreichend gute Färbung, bei einer mit unfixierten Proben vergleichbaren RNA Integrität. Prinzipiell ist die neu entwickelte Methode auch für andere Antikörper anwendbar, sie muss jedoch für jeden gewünschten Antikörper individuell ausgetestet werden. Die modifizierte FOXP3-Färbetechnik erweitert in Zukunft die zur Verfügung stehenden Marker zur Zellcharakterisierung für vergleichende RNA-Analysen um intrazelluläre/intranukleäre Antigene. Dies eröffnet neue Möglichkeiten, vor allem bei der Forschung an humanen Geweben, bei denen nicht jedes Gen in Kombination mit bestimmten Reportern exprimiert werden kann.

5.3 Differenzierung regulatorischer T-Zellen nach FOXP3-Verlust

Die Relevanz adoptiv transferierter Spender-Treg für die Prävention und/oder Therapie der GvHD nach allogener SZT deutete sich bereits in mehreren experimentellen Studien im Tiermodell sowie in ersten klinischen Studien im Menschen an [164-167]. Von fundamentaler Bedeutung für die Effektivität der Therapie ist die Reinheit und Stabilität der Zellprodukte. Hoffmann et al. konnten zeigen, dass vor allem die CD45RA⁺ Treg-Population auch während einer längeren *in vitro* Expansion stabil FOXP3 exprimiert, während CD45RA⁻ Treg zum Teil FOXP3 verlieren [99, 147]. In dieser Arbeit galt das Augenmerk jenen Zellen, welche FOXP3 verlieren. Es sollte untersucht werden, ob diese eventuell für den Empfänger schädlich sein und eine GvHD noch verstärken bzw. diese auslösen könnten. Um die CD4⁺CD25^{high}CD45RA⁻ Treg, welche nach *in vitro* Expansion FOXP3 verlieren, näher charakterisieren zu können, wurden sie nach Expansion mit Hilfe des FACS unter Verwendung der Ethanol/Trypton Methode in FOXP3⁺ und FOXP3⁻ Populationen sortiert. Anschließend wurde von den verschiedenen Populationen RNA isoliert, welche mithilfe von Gesamt-Genom-Microarrays analysiert wurde. Des Weiteren wurden *in vitro* expandierte CD4⁺CD25^{high}CD45RA⁻ Treg durchflusszytometrisch auf die Expression von „Masterregulatoren“ und die Sekretion „liniendefinierender“ Zytokine untersucht.

FOXP3-stabile *in vitro* expandierte Treg wiesen, wie erwartet, ein ausgeprägtes Treg Signaturmuster auf und exprimierten GATA3 mRNA niedrig. *In vitro* expandierte CD4⁺CD25^{high}CD45RA⁺ Zellen wiesen hierbei das gleiche Muster wie die gezeigten FOXP3-stabilen CD4⁺CD25^{high}CD45RA⁻ Zellen auf (Daten nicht abgebildet).

Hingegen zeigten FOXP3-instabile CD4⁺CD25^{high}CD45RA⁻ Zellen Gensignaturen für Transkriptionsfaktoren, Zytokine und Zelloberflächenmoleküle (GATA3, IL-4, GFI1), welche

vor allem auf/in Th2 Zellen zu finden sind. Treg relevante Gene hingegen zeigten sich herunter reguliert (CTLA4 und IL-2R α).

Im Gegensatz zu den Microarraydaten zeigten sich durchflusszytometrisch die FOXP3-stabilen CD4⁺CD25^{high}CD45RA⁻ Treg nach *in vitro* Expansion und PMA/Ionomycin Stimulation homogen GATA3 positiv, eine Beobachtung die wohl am ehesten durch die vorangehende Stimulation der Zellen vor der durchflusszytometrischen Analyse zustande kommt (im Gegensatz hierzu waren die für die Microarraydaten verwendeten Zellen unstimuliert). Eine Messung der GATA3 Expression ohne vorangehende Stimulation erwies sich jedoch in den vorangehenden Versuchen als nicht zielführend.

FOXP3-instabile Treg teilten sich in eine kleinere GATA^{low}- und eine größere GATA^{high}-Fraktion auf, wobei sich für diese Subpopulationen hier durchflusszytometrisch des Weiteren ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von GATA3 und der Produktion von Th2 Zytokinen zeigte. Zudem exprimierten die FOXP3-instabilen Zellen signifikant mehr Th2 Zytokine und deren entsprechenden Gene (IL-4, IL-5, IL-13) als Zytokine bzw. Zytokingene der Th1 oder Th17 Linien (IFN γ , IL-17).

In FOXP3-stabilen CD4⁺CD25^{high}CD45RA⁻ Zellen zeigte sich hingegen kein Zusammenhang zwischen der hohen GATA3 Expression und der Expression Th2-assoziiierter Zytokine. FOXP3-stabile *in vitro* expandierte Treg zeigten sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene kaum Produktion von Th2 Zytokinen.

Hinweise auf eine verstärkte Expression der Gene RORC (Th17) und STAT1 (Th1) ergaben sich in keiner der untersuchten Gruppen. Auch zeigte sich die Suche nach der Expression von Zytokinmustern, welche für andere T-Helferzellsubpopulationen charakterisierend sind, erfolglos (IFN γ , IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-17, IL-21, IL-23, und IL-24).

FOXP3⁺-stabile Treg zeigten sich in den vorliegenden durchflusszytometrischen Untersuchungen nach *in vitro* Expansion und PMA/Ionomycin Stimulation homogen GATA3⁺. Ergebnisse anderer Gruppen zeigten für 3d *in vitro* expandierte humane Treg (IL-2 und anti-CD3/anti-CD28 Antikörper) ähnliche Zahlen in der Durchflusszytometrie [168]. Trotzdem zeigten diese Zellen, sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene, kaum Produktion von Th2 Zytokinen. Dies entsprach auch den Ergebnissen der Forschergruppe um Wohlfert, diese fanden in FOXP3⁺ Zellen sowohl *in vivo*, als auch *in vitro*, keine Korrelation zwischen der GATA3 Expression und der Produktion von Th2 Zytokinen [168]. Inzwischen sind, zumindest in der Maus, auch Wege bekannt auf denen die Expression von Th2 Zytokinen in Treg Zellen trotz vorhandener GATA3 Expression gehemmt wird. Während in konventionellen T-Helferzellen GATA3 zur Expression der Th2 Zytokine führt, kann in Treg FOXP3-unabhängig via Bcl6 die GATA3-induzierte Expression von Th2 Zytokinen unterdrückt werden [169]. Auch in PBMC zeigte sich bereits an Tag 0 nach Stimulation eine kleine Gruppe FOXP3⁺GATA3⁺ Zellen (0,27%±0,14%, MW±SD, n=4 unterschiedliche

Spender, Daten nicht abgebildet) und auch Wohlfert et al. schilderten in FACS-Analysen das Auftreten einer kleinen Gruppe FOXP3⁺ Zellen innerhalb der CD4⁺CD127⁺CD25^{high} angereicherten PBMC, welche zumindest niedrig GATA3⁺ waren. Nun stellt sich jedoch die Frage nach der Funktion von GATA3 in FOXP3⁺ Treg. In Mausdaten korrelierte die RORγ(t) und die T-bet Expression in Treg invers mit der Expression von GATA3. Zudem wurde gezeigt, dass GATA3 unter physiologischen oder mild inflammatorischen Bedingungen die Expression von weiteren Transkriptionsfaktoren (RORγ(t), T-bet) und Effektorzytokinen (IL-17A) in nTreg verhindert [168, 170]. Prinzipiell wird dem Vorkommen von T-bet und RORγ(t) in Treg eine Aufgabe im Homing und der besseren Adaptation von Treg an die Gegebenheiten im Zielgewebe zugeschrieben [171]; dies kann jedoch unter extremen Bedingungen möglicherweise auch zum Klassenwechsel der Treg Richtung Th1/Th17 Zelle führen [94, 172]. GATA3 könnte hier eine Art Schutzfunktion haben, die das Treg Programm sichert. Wohlfert et al zeigten, dass es in GATA3-defizienten Mäusen bei Entzündung zu keiner adäquaten Akkumulation von Treg in entzündeten Geweben kommt und in diesen Tieren viele der Treg zudem die Fähigkeit zur Effektorzytokinproduktion erwarben. GATA3 bindet in Treg, ähnlich wie in Th2 Zellen, an die Tbx21 und RORC Genloci und limitiert dadurch deren Expression unter inflammatorischen Bedingungen [168]. Zudem wurde die Bindung von GATA3 an das CNS2 (TSDR) Segment in Treg beschrieben, welches eine nicht kodierende Sequenz des FOXP3 Locus ist. Diesem wurde vor Kurzem eine Bedeutung in der Wahrung der Treg Stabilität zugeschrieben [99, 100], welche durch die Bindung von GATA3 verstärkt wird [168, 170]. Wohlfert et al sind der Überzeugung, dass GATA3 in Treg an wichtigen „Barrieren des Immunsystems“ (wie z.B. Haut und GI) somit eher den Aktivierungsstatus von Treg widerspiegeln und nicht deren Adaptation an ein bestimmtes Milieu. Hier scheint die GATA3-Expression nötig um einerseits eine hohe FOXP3-Expression zu erhalten, andererseits jedoch auch eine Ansammlung von Treg in entzündeten Geweben zu gewährleisten ohne dabei eine übermäßige Polarisierung in Richtung eines Effektorphänotyps zuzulassen [168].

In vitro Versuche zeigten, dass die GATA3-Expression in Treg über die TCR-Stimulation und IL-2 induziert werden kann [173, 174]. Die hier erfolgte Stimulation während der Expansion wäre also durchaus für die Expression von GATA3 förderlich. In diesem Hintergrund gibt es wohl keinen Widerspruch zwischen den Ergebnissen aus den Microarrays (GATA3 mRNA niedrig exprimiert in FOXP3-stabilen Treg) und den durchflusszytometrischen Messungen (hohe GATA3 Expression in FOXP3-stabilen Treg). Während der Expansion wurde bereits die GATA3-Expression in den *in vitro* expandierten Treg Zellen durch deren TCR-abhängige Stimulation und IL-2 gefördert. Während des „Ruhigstellens“ wurde jedoch transient nur sehr wenig/keine GATA3 mRNA exprimiert und somit auch nicht erfasst. Möglicherweise wurde

die Expression jedoch durch die den durchflusszytometrischen Messungen vorangehende Restimulation wieder erhöht und dadurch messbar.

Die GATA3 Expression in FOXP3-stabilen Treg nach Stimulation ist jedoch in so weit von der zu unterscheiden, welche FOXP3-instabile Treg zum großen Teil aufweisen, da sich in FOXP3-stabilen Treg kein Zusammenhang zwischen der GATA3 Expression und der Produktion von Th2 Zytokinen zeigte. Vergleichende epigenetische Untersuchungen zwischen FOXP3-stabilen und -instabilen Zellen zeigten inzwischen jedoch, dass prinzipiell in allen Treg Zellen die GATA3-Transkription möglich ist, die Histonmodifikationen am GATA3-Lokus zwischen den beiden Gruppen sich also nicht unterscheiden [175].

CD4⁺CD25^{high}CD45RA⁻ Zellen, welche nach *in vitro* Expansion FOXP3⁻ waren, zeigten, sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene übereinstimmend überwiegend einen Geno- und Phänotyp welcher dem von Th2 Zellen entspricht. Diese erzielten Ergebnisse widersprechen der Beobachtung einiger Arbeitsgruppen, welche postulierten, dass Treg nach FOXP3-Verlust vornehmlich Th1/Th17 Zytokine produzieren [172, 176-180]. Es gibt jedoch auch Arbeitsgruppen, welche ähnliche Beobachtungen teilten und insbesondere in murinen Zellen wurden ähnliche Ergebnisse erzielt [181]. So resultierte in C57BL/6 Mäusen die künstlich induzierte Abschwächung von Foxp3 im Erhalt von Zellen, welche überwiegend einen Th2 Phänotyp aufzeigten [182]. Tatsächlich scheint zwischen Th2 und Treg Zellen eine engere Verbindung zu bestehen als ursprünglich angenommen [183]. Es gibt deutliche Hinweise, dass GATA3 und FOXP3 in gegenseitiger Wechselwirkung gemeinsam sowohl ihre eigene Transkription, als auch die des FOXP3-nachgeschalteten Transkriptionsprogramms regulieren [174]. Der entscheidende Vorgang während der *in vitro* Kultivierung regulatorischer T-Zellen ist folgerichtig eher im Verlust von FOXP3 zu sehen und nicht (wie man auch vermuten könnte) in einer überschießenden GATA3-Expression und daraus folgendem möglichem FOXP3-Verlust. Sekundär führt dann der Verlust von FOXP3 zu einer Hochregulierung der Th2-Zytokinexpression. Zu einem ähnlichen Schluss kam auch die Arbeitsgruppe um Haiqi et al., sie nannten insbesondere die Störung der normalerweise *in vivo* stattfindenden Regulationsmechanismen zwischen GATA3 und FOXP3 durch die anhaltende TCR-abhängige Stimulation und IL-2 während der Expansion als mögliche Ursache des FOXP3-Verlusts. Auch in der Maus führte in FOXP3⁺GATA3⁺ Zellen eine künstlich induzierte FOXP3 Erniedrigung (und nicht die Induktion von GATA3) zur Entstehung eines Th2 Phänotyps [168]. Diese Entwicklung in FOXP3^{low} Zellen schien dabei unabhängig vom IL-4/STAT6 Signalweg abzulaufen (wie dies in konventionellen T-Zellen der Fall ist), bedurfte aber trotzdem der Expression von GATA3 [184]. Andere Arbeitsgruppen zeigten, dass die Inaktivierung von IRF4 in FOXP3⁺ Zellen zu einer erhöhten Th2 Zytokinproduktion führt und die Neubildung von Keimzentren im Darm erhöhte [185]. Fagarasan und Kollegen zeigten, dass FOXP3⁺ Treg in den Peyer-Plaques die Fähigkeit

besitzen zu follikulären Helferzellen (T_{fh}) zu differenzieren, welche sich dann an der Bildung neuer Keimzentren beteiligen und die Immunglobulin A-Synthese im Darmtrakt fördern [186, 187]. Die Differenzierung von Treg zu T_{fh} Zellen bedurfte jedoch neben dem Verlust der FOXP3-Expression die Interaktion mit B-Zellen durch CD40 [188]. In Mäusen fand man nach Helmintheninfektionen in lymphatischen Organen IL-4-exprimierende CD4⁺ T-Zellen welche die T_{fh} Marker CXCR5, PD1 und ICOS exprimierten. Diese T_{fh} Zellen exprimierten nicht nur Bcl6 und IL-21 sondern auch GATA3 [189]. Inwieweit diese Daten, welche fast ausschließlich aus Mausexperimenten stammen, jedoch auf den Menschen übertragbar sind, ist nicht eindeutig zu sagen, zumal in Mäusen keine analoge Unterscheidung der Treg in CD45RA⁺ und CD45RA⁻ Treg möglich ist.

Vor dem Hintergrund der allogenen SZT stellt sich die Frage, ob die von uns untersuchten FOXP3-instabilen Treg das Potential besitzen, dem Empfänger zu schaden, wenn sie ihm als Teil eines Treg-Zellproduktes verabreicht wurden. Sowohl FOXP3-instabile *in vitro* expandierte Treg, als auch Th2 Zellen exprimieren GATA3 und Th2 Zytokine. Th2 Zellen besitzen die Fähigkeit, das Immunsystem zu aktivieren, insbesondere in einem Organismus, welcher bereits durch die Konditionierungstherapie geschädigtes Gewebe aufweist. Sollte eine Entwicklung der FOXP3-instabilen Treg in Richtung T_{fh} Zellen möglich sein, wäre dies unter Umständen eine Gefahr für den Empfänger, da diese über die Aktivierung von B-Zellen eine bereits bestehende Entzündungsreaktion verstärken könnten. Diese Vermutung wird unter anderem auch durch die Beobachtung gestützt, dass FOXP3-instabile Zellen erheblich mehr Mengen an proinflammatorischen Zytokinen exprimierten als in PBMC üblich. In frisch isolierten Zellen beobachtete man abgesehen von IFN γ einen Anteil an IL-4/IL-13/IL-17-produzierenden Zellen, der nie 15% überschritt. Nach *in vitro* Expansion jedoch stieg der Anteil an Zellen, welche ein bestimmtes Zytokin produzieren, bis auf ca. 30% der FOXP3⁻ Zellen an. Die Auswirkung der Transplantation solcher Zellen auf das Immunsystem des Empfängers ist nach derzeitigem Wissensstand nicht beurteilbar und muss als potentiell schädlich betrachtet werden. Die gewonnenen Ergebnisse sind somit sowohl aus wissenschaftlicher als auch aus klinisch-therapeutischer Sicht von fundamentaler Bedeutung. Die Tatsache, dass hier insbesondere in der Diskussion zur Entwicklung der nach *in vitro* Stimulation FOXP3-instabilen CD4⁺CD25^{high}CD45RA⁻ Zellen überwiegend auf Daten aus Mausexperimenten verwiesen wird, unterstreicht zudem die Bedeutung der in dieser Arbeit entwickelten Methode zur intranukleären FACS-Färbung und RNA-Extraktion, da hierdurch erstmals Transkriptomanalysen an FOXP3-sortierten menschlichen Treg möglich sind.

5.4 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es instabile Treg nach Verlust von FOXP3 immunphänotypisch, funktionell und molekularbiologisch zu charakterisieren und damit deren potentiell Risiko als Kontamination von Treg Produkten für den adoptiven Transfer abzuschätzen. Die Wichtigkeit der Ergebnisse ergibt sich durch den zunehmenden Einsatz von Treg Produkten in klinischen Studien zur Prophylaxe bzw. Therapie der Graft-versus-Host Erkrankung nach allogener Stammzelltransplantation sowie im Rahmen der Behandlung von Autoimmunerkrankungen. Dies sollte einerseits durch die Erweiterung der für die FACS-Färbung zur Verfügung stehenden Antikörper um die Transkriptionsfaktorantikörper gegen T-bet, GATA3 und ROR γ (t) ermöglicht werden. Andererseits sollte die Entwicklung neuer Färbeprotokolle die Isolation intakter RNA für anschließende Transkriptomanalysen aus *in vitro* expandierten und spezifisch für FOXP3 FACS-separierten humanen regulatorischen T-Zellen möglich machen.

Es wurde gezeigt, dass die sogenannten liniendefinierenden Transkriptionsfaktoren T-bet, GATA3 und ROR γ (t) nicht ausschließlich in Zellen der jeweiligen T-Helferzelllinien exprimiert werden. Dies erweitert unser Verständnis von T-Helferzelldifferenzierung und Plastizität dahingehend, dass zur Identifikation spezifischer T-Zellfunktionen nicht die Analyse eines einzelnen Transkriptionsfaktors ausreicht, sondern vielmehr die Kenntnis eines möglichst detaillierten Transkriptionsfaktor- und Zytokinprofils notwendig ist. Als Ausnahme ist hier FOXP3 zu nennen, dessen stabile Expression für sich alleine als definierender Marker für regulatorische T-Zellen ausreichend zu sein scheint.

Mit der Etablierung des Protokolls für eine intrazelluläre Färbung mittels Ethanol/Tryptonpuffer steht eine neue Methode zur Verfügung, FACS-Analysen von intra- und extrazellulären Molekülen durchzuführen und anschließend eine Isolation intakter mRNA durchzuführen. Nach einer individuellen Austestung der neuen Färbemethode für andere Transkriptionsfaktoren ist es zudem in Zukunft möglich Transkriptomanalysen an Zellpopulationen durchzuführen, die sich überwiegend oder sogar ausschließlich durch die Expression spezieller intrazellulärer Marker definieren. In dieser Arbeit werden erstmals Transkriptomanalysen an FOXP3-sortierten menschlichen Treg durchgeführt.

Mit Hilfe der neuen Methode gelang es nachzuweisen, dass *in vitro* expandierte CD4⁺CD25^{high}CD45RA⁻ Zellen, welche nach Expansion ihr FOXP3 verlieren, vor allem zu Th2 Zellen differenzieren. Dies zeigt sich sowohl auf Protein wie auch auf mRNA Ebene. Die Wichtigkeit dieser Ergebnisse wird dadurch unterstrichen, dass der Anteil zytokinproduzierender Zellen in *in vitro* expandierten CD4⁺CD25^{high}CD45RA⁻ FOXP3⁻ Zellen höher ist als der unter den CD4⁺ konventionellen T-Zellen im peripheren Blut. Für die klinische

Anwendung von *in vitro* expandierten Treg zur Prophylaxe und/oder Therapie der GvHD nach allogener SZT erscheinen deshalb insbesondere expansionsstabile CD45RA⁺ Treg geeignet.

6 Anhang

6.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Allgemeine Verbrauchsmaterialien.....	18
Tabelle 2: AF 488-markierte anti-human Antikörper	18
Tabelle 3: Alexa Fluor 647-markierte anti-human Antikörper	18
Tabelle 4: Allophycocyanin-markierte anti-human Antikörper	19
Tabelle 5: eFluor450-markierte anti-human Antikörper	19
Tabelle 6: FITC-markierte anti-human Antikörper	19
Tabelle 7: Pacific Blue-markierte anti-human Antikörper	19
Tabelle 8: PE-markierte anti-human Antikörper	19
Tabelle 9: PerCP-markierte anti-human Antikörper	20
Tabelle 10: PE-Cy7-markierte anti-human Antikörper.....	20
Tabelle 11: Chemikalien und Reagenzien	20
Tabelle 12: Enzyme, Stimulanzen und Kits.....	21
Tabelle 13: Geräte und Ausrüstungsgegenstände.....	21
Tabelle 14: Medien, Puffer, Lösungen und deren Zusammensetzungen	22
Tabelle 15: Software	23
Tabelle 16: Populationsgrößen und MFI von T-bet in den untersuchten Zytokinproduzenten.....	38
Tabelle 17: Populationsgrößen und MFI von GATA3 in den untersuchten Zytokinproduzenten.....	39
Tabelle 18: Anteil GATA3 ⁺ Zellen in den einzelnen Zytokinproduzenten und deren MFI für GATA3	40
Tabelle 19: Populationsgrößen und gemessene MFI von RORγ(t) der untersuchten Zytokinproduzenten	42
Tabelle 20: Reanalysen der sortierten FOXP3 ⁺ / ⁻ Populationen nach Färbung mit 70% Ethanol/2% Trypton.....	50
Tabelle 21: Anteil der zytokinproduzierenden FOXP3-stabilen bzw. -instabilen unter den gesamten <i>in vitro</i> expandierten CD45RA ⁻ Treg.....	54
Tabelle 22: Zytokindoppelproduzenten in <i>in vitro</i> expandierten CD45RA ⁻ Treg.....	55

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Humane Hämatopoese	1
Abbildung 2: Differenzierungswege und Charakteristika verschiedener CD4 ⁺ T-Zellsubpopulationen	7
Abbildung 3: Modell zur Pathophysiologie der akuten GvHD	14
Abbildung 4: FOXP3-Expression in Abhängigkeit von CD25 unter CD4 ⁺ T-Zellen	33
Abbildung 5: T-bet Expression in humanen PBMC Subpopulationen.....	34
Abbildung 6: GATA3 Expression in humanen PBMC Subpopulationen	35
Abbildung 7: RORγ(t)-Expression in humanen PBMC Subpopulationen.....	36
Abbildung 8: T-bet, GATA3, RORγ(t) und FOXP3-Expression in stimulierten PBMC in Abhängigkeit von CD4	37
Abbildung 9: T-bet Expression in IFNγ-, IL-13-, bzw. IL-17-produzierenden CD4 ⁺ T-Zellen ..	38
Abbildung 10: GATA3 Expression in IFNγ-, IL-13-, bzw. IL-17-produzierenden CD4 ⁺ T-Zellen	39
Abbildung 11: Vergleich der GATA3 Expression in CD4 ⁺ T-Zellen mit verschiedenen Zytokinexpressionsprofilen	41
Abbildung 12: RORγ(t)-Expression in IFNγ-, IL-13-, bzw. IL-17-produzierenden CD4 ⁺ T-Zellen	42
Abbildung 13: Oberflächenfärbung und intranukleäre FOXP3-Färbung nach Fixierung und Permeabilisierung mit Ethanol bzw. Methanol im Vergleich zum kommerziell erhältlichen Färbeset.....	44
Abbildung 14: Oberflächenfärbung und intranukleäre FOXP3-Färbung in FACS-Puffer bzw. in purem PBS nach Fixierung und Permeabilisierung mit 70%igem Ethanol.....	45
Abbildung 15: Agarose-Gelelektrophoresen von RNAs aus <i>in vitro</i> expandierten Treg nach Ethanolfixierung und Färbung mit unterschiedlichen Puffern im Vergleich zu unfixierten Zellen	47
Abbildung 16: FACS-Färbungen unter Verwendung unterschiedlicher Puffer für die intranukleäre FOXP3-Färbung	48
Abbildung 17: FACS-Separation <i>in vitro</i> expandierter Treg in FOXP3 ⁺ und FOXP3 ⁻ Fraktionen und anschließende Extraktion von RNA	49
Abbildung 18: Zellsortierung anhand der FOXP3-Expression und anschließende Reanalysen der erhaltenen Populationen.....	50
Abbildung 19: Gating zur Separation FOXP3 ⁺ und FOXP3 ⁻ <i>in vitro</i> expandierter CD45RA ⁻ Treg nach Färbung in Ethanol/Trypton	51
Abbildung 20: Transkriptomanalyse humaner FOXP3 selektierter <i>in vitro</i> expandierter CD45RA ⁻ Treg	52

Abbildung 21: Zytokinexpression in <i>in vitro</i> expandierten CD45RA ⁺ Treg in Abhängigkeit von FOXP3	54
Abbildung 22: Darstellung simultaner Zytokinexpressionen in <i>in vitro</i> expandierten CD45RA ⁺ Treg.....	55
Abbildung 23: T-bet Expression in <i>in vitro</i> expandierten CD45RA ⁺ Treg in Abhängigkeit von FOXP3 bzw. der IL-13 und IFN γ Produktion.....	56
Abbildung 24: GATA3 Expression in <i>in vitro</i> expandierten CD45RA ⁺ Treg	57
Abbildung 25: GATA3 Expression in IFN γ -, IL-4- bzw. IL-17-positiven <i>in vitro</i> expandierten CD45RA ⁺ Treg	57
Abbildung 26: T-bet Expression und Funktion in ausgewählten Zelltypen des Immunsystems	59

7 Literaturverzeichnis

1. Passegue, E., et al., *Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics?* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100 Suppl 1: p. 11842-9.
2. Benacerraf, B. and H.O. McDevitt, *Histocompatibility-linked immune response genes.* Science, 1972. 175(4019): p. 273-9.
3. Janeway, C., *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.*, Garland Science: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27156/#583>. p. Kapitel: The major histocompatibility complex and its functions.
4. Van Parijs, L. and A.K. Abbas, *Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off.* Science, 1998. 280(5361): p. 243-8.
5. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immunity.* N Engl J Med, 2000. 343(5): p. 338-44.
6. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immune recognition: mechanisms and pathways.* Immunol Rev, 2000. 173: p. 89-97.
7. Huppa, J.B. and M.M. Davis, *T-cell-antigen recognition and the immunological synapse.* Nat Rev Immunol, 2003. 3(12): p. 973-83.
8. Kagi, D., et al., *Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo.* Annu Rev Immunol, 1996. 14: p. 207-32.
9. Bjorkman, P.J., *MHC restriction in three dimensions: a view of T cell receptor/ligand interactions.* Cell, 1997. 89(2): p. 167-70.
10. Gao, G.F., Z. Rao, and J.I. Bell, *Molecular coordination of alphabeta T-cell receptors and coreceptors CD8 and CD4 in their recognition of peptide-MHC ligands.* Trends Immunol, 2002. 23(8): p. 408-13.
11. Schwarz, B.A. and A. Bhandoola, *Trafficking from the bone marrow to the thymus: a prerequisite for thymopoiesis.* Immunol Rev, 2006. 209: p. 47-57.
12. Starr, T.K., S.C. Jameson, and K.A. Hogquist, *Positive and negative selection of T cells.* Annu Rev Immunol, 2003. 21: p. 139-76.
13. Warren, H.S. and L.J. Skipsey, *Loss of activation-induced CD45RO with maintenance of CD45RA expression during prolonged culture of T cells and NK cells.* Immunology, 1991. 74(1): p. 78-85.
14. Dutton, R.W., L.M. Bradley, and S.L. Swain, *T cell memory.* Annu Rev Immunol, 1998. 16: p. 201-23.
15. Hermiston, M.L., Z. Xu, and A. Weiss, *CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells.* Annu Rev Immunol, 2003. 21: p. 107-37.
16. Fukuhara, K., et al., *A study on CD45 isoform expression during T-cell development and selection events in the human thymus.* Hum Immunol, 2002. 63(5): p. 394-404.
17. Clement, L.T., *Isoforms of the CD45 common leukocyte antigen family: markers for human T-cell differentiation.* J Clin Immunol, 1992. 12(1): p. 1-10.
18. Zhu, J. and W.E. Paul, *CD4 T cells: fates, functions, and faults.* Blood, 2008. 112(5): p. 1557-69.
19. Cherwinski, H.M., et al., *Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies.* J Exp Med, 1987. 166(5): p. 1229-44.
20. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.* J Immunol, 1986. 136(7): p. 2348-57.
21. Wierenga, E.A., et al., *Human atopen-specific types 1 and 2 T helper cell clones.* J Immunol, 1991. 147(9): p. 2942-9.
22. Del Prete, G.F., et al., *Purified protein derivative of Mycobacterium tuberculosis and excretory-secretory antigen(s) of Toxocara canis expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production.* J Clin Invest, 1991. 88(1): p. 346-50.

23. Smith, J., *Brachyury and the T-box genes*. Curr Opin Genet Dev, 1997. 7(4): p. 474-80.
24. Papaioannou, V.E., *T-box family reunion*. Trends Genet, 1997. 13(6): p. 212-3.
25. Seder, R.A. and W.E. Paul, *Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells*. Annu Rev Immunol, 1994. 12: p. 635-73.
26. Szabo, S.J., et al., *Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses*. Annu Rev Immunol, 2003. 21: p. 713-58.
27. Szabo, S.J., et al., *A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment*. Cell, 2000. 100(6): p. 655-69.
28. Gokmen, M.R., et al., *Genome-wide regulatory analysis reveals that T-bet controls Th17 lineage differentiation through direct suppression of IRF4*. J Immunol, 2013. 191(12): p. 5925-32.
29. Zhang, Y., W. Gu, and B. Sun, *TH1/TH2 cell differentiation and molecular signals*. Adv Exp Med Biol, 2014. 841: p. 15-44.
30. Robinson, D.S., et al., *Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma*. N Engl J Med, 1992. 326(5): p. 298-304.
31. Kaplan, M.H., et al., *Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells*. Immunity, 1996. 4(3): p. 313-9.
32. Zhang, D.H., et al., *Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene*. J Biol Chem, 1997. 272(34): p. 21597-603.
33. Zheng, W. and R.A. Flavell, *The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells*. Cell, 1997. 89(4): p. 587-96.
34. Mowen, K.A. and L.H. Glimcher, *Signaling pathways in Th2 development*. Immunol Rev, 2004. 202: p. 203-22.
35. Ho, I.C., T.S. Tai, and S.Y. Pai, *GATA3 and the T-cell lineage: essential functions before and after T-helper-2-cell differentiation*. Nat Rev Immunol, 2009. 9(2): p. 125-35.
36. Kouros-Mehr, H., et al., *GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland*. Cell, 2006. 127(5): p. 1041-55.
37. de Guzman Strong, C., et al., *Lipid defect underlies selective skin barrier impairment of an epidermal-specific deletion of Gata-3*. J Cell Biol, 2006. 175(4): p. 661-70.
38. Kaufman, C.K., et al., *GATA-3: an unexpected regulator of cell lineage determination in skin*. Genes Dev, 2003. 17(17): p. 2108-22.
39. Lim, K.C., et al., *Gata3 loss leads to embryonic lethality due to noradrenaline deficiency of the sympathetic nervous system*. Nat Genet, 2000. 25(2): p. 209-12.
40. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol, 2005. 6(11): p. 1123-32.
41. Park, H., et al., *A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17*. Nat Immunol, 2005. 6(11): p. 1133-41.
42. Langrish, C.L., et al., *IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation*. J Exp Med, 2005. 201(2): p. 233-40.
43. Lewis, B.J., et al., *Predominance of activated, clonally expanded Th17 cells within the CD4+ T cell population in psoriatic lesions*. Clin Exp Immunol, 2013.
44. Korn, T., et al., *IL-17 and Th17 Cells*. Annu Rev Immunol, 2009. 27: p. 485-517.
45. Stockinger, B. and M. Veldhoen, *Differentiation and function of Th17 T cells*. Curr Opin Immunol, 2007. 19(3): p. 281-6.
46. Chen, Z., A. Laurence, and J.J. O'Shea, *Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation*. Semin Immunol, 2007. 19(6): p. 400-8.
47. Yang, X.O., et al., *T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma*. Immunity, 2008. 28(1): p. 29-39.
48. Mudter, J., et al., *IRF4 regulates IL-17A promoter activity and controls RORgamma-dependent Th17 colitis in vivo*. Inflamm Bowel Dis, 2011. 17(6): p. 1343-58.

49. He, Y.W., et al., *RORgamma t, a novel isoform of an orphan receptor, negatively regulates Fas ligand expression and IL-2 production in T cells*. Immunity, 1998. 9(6): p. 797-806.
50. Ivanov, I.I., Zhou, L., and D.R. Littman, *Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation*. Semin Immunol, 2007. 19(6): p. 409-17.
51. Bennett, C.L., et al., *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3*. Nat Genet, 2001. 27(1): p. 20-1.
52. Joly, A.L., et al., *Foxp3 lacking exons 2 and 7 is unable to confer suppressive ability to regulatory T cells in vivo*. J Autoimmun, 2015. 63: p. 23-30.
53. Lyon, M.F., et al., *The scurfy mouse mutant has previously unrecognized hematological abnormalities and resembles Wiskott-Aldrich syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(7): p. 2433-7.
54. Edinger, M., *Regulatory T cells for the prevention of graft-versus-host disease: professionals defeat amateurs*. Eur J Immunol, 2009. 39(11): p. 2966-8.
55. Jordan, M.S., et al., *Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide*. Nat Immunol, 2001. 2(4): p. 301-6.
56. Kawahata, K., et al., *Generation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells from autoreactive T cells simultaneously with their negative selection in the thymus and from nonautoreactive T cells by endogenous TCR expression*. J Immunol, 2002. 168(9): p. 4399-405.
57. Hsieh, C.S., et al., *Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors*. Immunity, 2004. 21(2): p. 267-77.
58. Zuo, T., et al., *FOXP3 is an X-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the HER-2/ErbB2 oncogene*. Cell, 2007. 129(7): p. 1275-86.
59. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. 299(5609): p. 1057-61.
60. Fontenot, J.D., et al., *Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3*. Immunity, 2005. 22(3): p. 329-41.
61. Edinger, M. and P. Hoffmann, *Regulatory T cells in stem cell transplantation: strategies and first clinical experiences*. Curr Opin Immunol, 2011. 23(5): p. 679-84.
62. Mahmud, S.A., L.S. Manlove, and M.A. Farrar, *Interleukin-2 and STAT5 in regulatory T cell development and function*. JAKSTAT, 2013. 2(1): p. e23154.
63. Zorn, E., et al., *IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo*. Blood, 2006. 108(5): p. 1571-9.
64. Liu, W., et al., *CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells*. J Exp Med, 2006. 203(7): p. 1701-11.
65. Seddiki, N., et al., *Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells*. J Exp Med, 2006. 203(7): p. 1693-700.
66. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*. J Exp Med, 2000. 192(2): p. 303-10.
67. Shimizu, J., et al., *Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance*. Nat Immunol, 2002. 3(2): p. 135-42.
68. Scheffold, A., J. Huhn, and T. Hofer, *Regulation of CD4+CD25+ regulatory T cell activity: it takes (IL-)two to tango*. Eur J Immunol, 2005. 35(5): p. 1336-41.
69. Collison, L.W., et al., *The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function*. Nature, 2007. 450(7169): p. 566-9.
70. Shevach, E.M., et al., *The critical contribution of TGF-beta to the induction of Foxp3 expression and regulatory T cell function*. Eur J Immunol, 2008. 38(4): p. 915-7.
71. Koebe, J.J., et al., *T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine*. J Immunol, 2006. 177(10): p. 6780-6.

72. Deaglio, S., et al., *Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression*. J Exp Med, 2007. 204(6): p. 1257-65.
73. Borsellino, G., et al., *Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression*. Blood, 2007. 110(4): p. 1225-32.
74. Bopp, T., et al., *Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression*. J Exp Med, 2007. 204(6): p. 1303-10.
75. Zhao, D.M., et al., *Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes*. Blood, 2006. 107(10): p. 3925-32.
76. Ren, X., et al., *Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells*. Cell Death Differ, 2007. 14(12): p. 2076-84.
77. Piccirillo, C.A. and E.M. Shevach, *Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells*. J Immunol, 2001. 167(3): p. 1137-40.
78. Lim, H.W., et al., *Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells*. J Immunol, 2005. 175(7): p. 4180-3.
79. Nakamura, K., et al., *TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice*. J Immunol, 2004. 172(2): p. 834-42.
80. Gri, G., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction*. Immunity, 2008. 29(5): p. 771-81.
81. Ghiringhelli, F., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner*. J Exp Med, 2005. 202(8): p. 1075-85.
82. Azuma, T., et al., *Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions*. Cancer Res, 2003. 63(15): p. 4516-20.
83. Misra, N., et al., *Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells*. J Immunol, 2004. 172(8): p. 4676-80.
84. Tang, Q., et al., *Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice*. Nat Immunol, 2006. 7(1): p. 83-92.
85. Tadokoro, C.E., et al., *Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo*. J Exp Med, 2006. 203(3): p. 505-11.
86. Liang, B., et al., *Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II*. J Immunol, 2008. 180(9): p. 5916-26.
87. Tang, Q., et al., *Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function*. Eur J Immunol, 2004. 34(11): p. 2996-3005.
88. Wing, K., et al., *CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function*. Science, 2008. 322(5899): p. 271-5.
89. Jonuleit, H., et al., *Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells*. J Exp Med, 2002. 196(2): p. 255-60.
90. Hori, S., *Developmental plasticity of Foxp3+ regulatory T cells*. Curr Opin Immunol, 2010. 22(5): p. 575-82.
91. DiPaolo, R.J., et al., *Autoantigen-specific TGFbeta-induced Foxp3+ regulatory T cells prevent autoimmunity by inhibiting dendritic cells from activating autoreactive T cells*. J Immunol, 2007. 179(7): p. 4685-93.
92. Davidson, T.S., et al., *Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells*. J Immunol, 2007. 178(7): p. 4022-6.
93. Huter, E.N., et al., *TGF-beta-induced Foxp3+ regulatory T cells rescue scurfy mice*. Eur J Immunol, 2008. 38(7): p. 1814-21.
94. Zhou, L., et al., *TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function*. Nature, 2008. 453(7192): p. 236-40.
95. Ziegler, S.F. and J.H. Buckner, *FOXP3 and the regulation of Treg/Th17 differentiation*. Microbes Infect, 2009. 11(5): p. 594-8.

96. Horwitz, D.A., et al., *Critical role of IL-2 and TGF-beta in generation, function and stabilization of Foxp3+CD4+ Treg*. Eur J Immunol, 2008. 38(4): p. 912-5.
97. Baron, U., et al., *DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells*. Eur J Immunol, 2007. 37(9): p. 2378-89.
98. Polansky, J.K., et al., *DNA methylation controls Foxp3 gene expression*. Eur J Immunol, 2008. 38(6): p. 1654-63.
99. Hoffmann, P., et al., *Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation*. Eur J Immunol, 2009. 39(4): p. 1088-97.
100. Zheng, Y., et al., *Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate*. Nature, 2010. 463(7282): p. 808-12.
101. Lexberg, M.H., et al., *Th memory for interleukin-17 expression is stable in vivo*. Eur J Immunol, 2008. 38(10): p. 2654-64.
102. Lee, Y.K., et al., *Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage*. Immunity, 2009. 30(1): p. 92-107.
103. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity*. Eur J Immunol, 2009. 39(8): p. 2076-82.
104. Hegazy, A.N., et al., *Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions*. Immunity, 2010. 32(1): p. 116-28.
105. Messi, M., et al., *Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes*. Nat Immunol, 2003. 4(1): p. 78-86.
106. Annunziato, F., et al., *Phenotypic and functional features of human Th17 cells*. J Exp Med, 2007. 204(8): p. 1849-61.
107. Shi, G., et al., *Phenotype switching by inflammation-inducing polarized Th17 cells, but not by Th1 cells*. J Immunol, 2008. 181(10): p. 7205-13.
108. Zielinski, C.E., et al., *Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta*. Nature, 2012. 484(7395): p. 514-8.
109. Atarashi, K., et al., *ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation*. Nature, 2008. 455(7214): p. 808-12.
110. Hall, J.A., et al., *Commensal DNA limits regulatory T cell conversion and is a natural adjuvant of intestinal immune responses*. Immunity, 2008. 29(4): p. 637-49.
111. Ivanov, I.I., et al., *Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine*. Cell Host Microbe, 2008. 4(4): p. 337-49.
112. Curiel, T.J., et al., *Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival*. Nat Med, 2004. 10(9): p. 942-9.
113. Ouyang, Z., et al., *Regulatory T cells in the immunotherapy of melanoma*. Tumour Biol, 2015.
114. Canavan, J.B., et al., *Developing in vitro expanded CD45RA+ regulatory T cells as an adoptive cell therapy for Crohn's disease*. Gut, 2015.
115. Bluestone, J.A., *Regulatory T-cell therapy: is it ready for the clinic?* Nat Rev Immunol, 2005. 5(4): p. 343-9.
116. Szanya, V., et al., *The subpopulation of CD4+CD25+ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7*. J Immunol, 2002. 169(5): p. 2461-5.
117. Morgan, M.E., et al., *Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25+ regulatory T cells*. Arthritis Rheum, 2005. 52(7): p. 2212-21.
118. Mottet, C., H.H. Uhlig, and F. Powrie, *Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells*. J Immunol, 2003. 170(8): p. 3939-43.
119. Wood, K.J. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells in transplantation tolerance*. Nat Rev Immunol, 2003. 3(3): p. 199-210.

120. Hoffmann, P. and M. Edinger, *CD4+CD25+ regulatory T cells and graft-versus-host disease*. Semin Hematol, 2006. 43(1): p. 62-9.
121. Michael, M., A. Shimoni, and A. Nagler, *Regulatory T cells in allogeneic stem cell transplantation*. Clin Dev Immunol, 2013. 2013: p. 608951.
122. Hoffmann, P., et al., *Immunomodulation after allogeneic bone marrow transplantation by CD4+CD25+ regulatory T cells*. Microbes Infect, 2005. 7(7-8): p. 1066-72.
123. Suchin, E.J., et al., *Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question*. J Immunol, 2001. 166(2): p. 973-81.
124. Robertson, N.J., et al., *Natural regulation of immunity to minor histocompatibility antigens*. J Immunol, 2007. 178(6): p. 3558-65.
125. Martin, P., *T-cell depletion for GVHD prevention in humans*. Marcel Dekker Inc., New York, 1997: p. p. pp. 618-637.
126. Travnik, R., et al., *[Graft-versus-Host Disease (GvHD) - an update : Part 1: Pathophysiology, clinical features and classification of GvHD]*. Hautarzt, 2011. 62(2): p. 139-54; quiz 155.
127. Flowers, M.E., et al., *Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria*. Blood, 2011. 117(11): p. 3214-9.
128. Hill, G.R. and J.L. Ferrara, *The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation*. Blood, 2000. 95(9): p. 2754-9.
129. Reddy, P. and J.L. Ferrara, *Immunobiology of acute graft-versus-host disease*. Blood Rev, 2003. 17(4): p. 187-94.
130. Xun, C.Q., et al., *Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice*. Blood, 1994. 83(8): p. 2360-7.
131. Beilhack, A., et al., *In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets*. Blood, 2005. 106(3): p. 1113-22.
132. Korngold, R. and J. Sprent, *Negative selection of T cells causing lethal graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers. Role of the H-2 complex*. J Exp Med, 1980. 151(5): p. 1114-24.
133. Gould, D.S. and H. Auchincloss, Jr., *Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection*. Immunol Today, 1999. 20(2): p. 77-82.
134. Lechler, R., W.F. Ng, and R.M. Steinman, *Dendritic cells in transplantation--friend or foe?* Immunity, 2001. 14(4): p. 357-68.
135. Sayegh, M.H. and C.B. Carpenter, *Role of indirect allorecognition in allograft rejection*. Int Rev Immunol, 1996. 13(3): p. 221-9.
136. Wysocki, C.A., et al., *Leukocyte migration and graft-versus-host disease*. Blood, 2005. 105(11): p. 4191-9.
137. Bhatia, S., *Long-term health impacts of hematopoietic stem cell transplantation inform recommendations for follow-up*. Expert Rev Hematol, 2011. 4(4): p. 437-52; quiz 453-4.
138. Zhai, Z., et al., *Correlation of the CD4+CD25high T-regulatory cells in recipients and their corresponding donors to acute GVHD*. Transpl Int, 2007. 20(5): p. 440-6.
139. Rezvani, K., et al., *High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT*. Blood, 2006. 108(4): p. 1291-7.
140. Martelli, M.F., et al., *HLA-haploidentical transplantation with regulatory and conventional T-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse*. Blood, 2014. 124(4): p. 638-44.
141. Hoffmann, P., et al., *Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation*. J Exp Med, 2002. 196(3): p. 389-99.

142. Taylor, P.A., C.J. Lees, and B.R. Blazar, *The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality*. Blood, 2002. 99(10): p. 3493-9.
143. Cohen, J.L., et al., *CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease*. J Exp Med, 2002. 196(3): p. 401-6.
144. Hoffmann, P., et al., *Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25^{high} regulatory T cells*. Blood, 2004. 104(3): p. 895-903.
145. Hippen, K.L., et al., *Massive ex vivo expansion of human natural regulatory T cells (T_{regs}) with minimal loss of in vivo functional activity*. Sci Transl Med, 2011. 3(83): p. 83ra41.
146. Hansmann, L., et al., *Isolation of intact genomic DNA from FOXP3-sorted human regulatory T cells for epigenetic analyses*. Eur J Immunol, 2010. 40(5): p. 1510-2.
147. Hoffmann, P., et al., *Only the CD45RA⁺ subpopulation of CD4⁺CD25^{high} T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion*. Blood, 2006. 108(13): p. 4260-7.
148. Hoffmann, P., R. Eder, and M. Edinger, *Polyclonal expansion of human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells*. Methods Mol Biol, 2011. 677: p. 15-30.
149. Sullivan, B.M., et al., *Antigen-driven effector CD8 T cell function regulated by T-bet*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(26): p. 15818-23.
150. Wang, N.S., et al., *Divergent transcriptional programming of class-specific B cell memory by T-bet and ROR α* . Nat Immunol, 2012. 13(6): p. 604-11.
151. Gordon, S.M., et al., *The transcription factors T-bet and Eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation*. Immunity, 2012. 36(1): p. 55-67.
152. Pandya, A.D., et al., *Identification of human NK17/NK1 cells*. PLoS One, 2011. 6(10): p. e26780.
153. Freud, A.G., et al., *Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo*. J Exp Med, 2006. 203(4): p. 1033-43.
154. Hansmann, L., et al., *Dominant Th2 differentiation of human regulatory T cells upon loss of FOXP3 expression*. J Immunol, 2012. 188(3): p. 1275-82.
155. Lazarevic, V., L.H. Glimcher, and G.M. Lord, *T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity*. Nat Rev Immunol, 2013. 13(11): p. 777-89.
156. Knox, J.J., et al., *Characterization of T-bet and eomes in peripheral human immune cells*. Front Immunol, 2014. 5: p. 217.
157. Marine, J. and A. Winoto, *The human enhancer-binding protein Gata3 binds to several T-cell receptor regulatory elements*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(16): p. 7284-8.
158. Omori, M., et al., *CD8 T cell-specific downregulation of histone hyperacetylation and gene activation of the IL-4 gene locus by ROG, repressor of GATA*. Immunity, 2003. 19(2): p. 281-94.
159. Kim, P.J., et al., *GATA-3 regulates the development and function of invariant NKT cells*. J Immunol, 2006. 177(10): p. 6650-9.
160. Pedicini, M., et al., *Combining network modeling and gene expression microarray analysis to explore the dynamics of Th1 and Th2 cell regulation*. PLoS Comput Biol, 2010. 6(12): p. e1001032.
161. Han, Q., et al., *Multidimensional analysis of the frequencies and rates of cytokine secretion from single cells by quantitative microengraving*. Lab Chip, 2010. 10(11): p. 1391-400.
162. Kreher, S., *Die Analyse der IL-4-Expressionsheterogenität in differenzierten Th2-Zellen*. Charité – Universitätsmedizin Berlin; Dissertation, 2008.
163. Jackson, D.P., et al., *Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction*. J Clin Pathol, 1990. 43(6): p. 499-504.
164. Theil, A., et al., *Adoptive transfer of allogeneic regulatory T cells into patients with chronic graft-versus-host disease*. Cytotherapy, 2015.
165. Ermann, J., et al., *Only the CD62L⁺ subpopulation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD*. Blood, 2005. 105(5): p. 2220-6.

166. Zhang, L.F. and C.Q. Xia, *Ex vivo expansion of regulatory T cells for clinical applications against graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Chin Med J (Engl), 2013. 126(23): p. 4575-82.
167. Di Ianni, M., et al., *Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation*. Blood, 2011. 117(14): p. 3921-8.
168. Wohlfert, E.A., et al., *GATA3 controls Foxp3(+) regulatory T cell fate during inflammation in mice*. J Clin Invest, 2011. 121(11): p. 4503-15.
169. Sawant, D.V., et al., *Bcl6 controls the Th2 inflammatory activity of regulatory T cells by repressing Gata3 function*. J Immunol, 2012. 189(10): p. 4759-69.
170. Wang, Y., M.A. Su, and Y.Y. Wan, *An essential role of the transcription factor GATA-3 for the function of regulatory T cells*. Immunity, 2011. 35(3): p. 337-48.
171. Campbell, D.J. and M.A. Koch, *Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells*. Nat Rev Immunol, 2011. 11(2): p. 119-30.
172. Zhou, X., et al., *Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo*. Nat Immunol, 2009. 10(9): p. 1000-7.
173. Bonelli, M., et al., *Helper T cell plasticity: impact of extrinsic and intrinsic signals on transcriptomes and epigenomes*. Curr Top Microbiol Immunol, 2014. 381: p. 279-326.
174. Rudra, D., et al., *Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network*. Nat Immunol, 2012. 13(10): p. 1010-9.
175. He, H., et al., *Histone methylation mediates plasticity of human FOXP3(+) regulatory T cells by modulating signature gene expressions*. Immunology, 2014. 141(3): p. 362-76.
176. Schmidl, C., et al., *Epigenetic reprogramming of the RORC locus during in vitro expansion is a distinctive feature of human memory but not naive Treg*. Eur J Immunol, 2011. 41(5): p. 1491-8.
177. Ayyoub, M., et al., *Human memory FOXP3+ Tregs secrete IL-17 ex vivo and constitutively express the T(H)17 lineage-specific transcription factor RORgamma t*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(21): p. 8635-40.
178. Beriou, G., et al., *IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function*. Blood, 2009. 113(18): p. 4240-9.
179. Zhou, L., M.M. Chong, and D.R. Littman, *Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation*. Immunity, 2009. 30(5): p. 646-55.
180. Zhu, J. and W.E. Paul, *Heterogeneity and plasticity of T helper cells*. Cell Res, 2010. 20(1): p. 4-12.
181. Williams, L.M. and A.Y. Rudensky, *Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3*. Nat Immunol, 2007. 8(3): p. 277-84.
182. Wan, Y.Y. and R.A. Flavell, *Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression*. Nature, 2007. 445(7129): p. 766-70.
183. Chapoval, S., et al., *Regulation of the T helper cell type 2 (Th2)/T regulatory cell (Treg) balance by IL-4 and STAT6*. J Leukoc Biol, 2010. 87(6): p. 1011-8.
184. Wang, Y., et al., *An intrinsic mechanism predisposes Foxp3-expressing regulatory T cells to Th2 conversion in vivo*. J Immunol, 2010. 185(10): p. 5983-92.
185. Zheng, Y., et al., *Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses*. Nature, 2009. 458(7236): p. 351-6.
186. Linterman, M.A., et al., *Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response*. Nat Med, 2011. 17(8): p. 975-82.
187. Fagarasan, S., et al., *Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis*. Annu Rev Immunol, 2010. 28: p. 243-73.
188. Tsuji, M., et al., *Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches*. Science, 2009. 323(5920): p. 1488-92.
189. Glatman Zaretsky, A., et al., *T follicular helper cells differentiate from Th2 cells in response to helminth antigens*. J Exp Med, 2009. 206(5): p. 991-9.

8 Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. med. Matthias Edinger bedanken, der es mir ermöglichte diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen und stets ein offenes Ohr für mich hatte.

Frau PD Dr. rer. nat. Petra Hoffmann danke ich ganz herzlich für die ausgezeichnete Anleitung und ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Dr. med. Leo Hansmann danke ich für die freundliche und professionelle Betreuung der Doktorarbeit und wünsche ihm für die Zukunft weiterhin viel Erfolg. Zudem danke ich ihm und Lena Steger für die Anfertigung der RNA Gele.

Besonderen Dank verdienen Dr. rer. nat. Kristina Doser und Rüdiger Eder, welche mir immer mit Ihrem Fachwissen und menschlich zur Seite standen.

Rüdiger Eder und Jasmin Stahl danke ich insbesondere für das hervorragende Zellsortieren und die regelmäßige Bereitstellung von *in vitro* expandierten regulatorischen T-Zellen.

Des Weiteren danke ich Jasmin Stahl, Lena Steger, Dr. rer. nat. Christian Schmidl, der AG Rehli und dem gesamten Team der Arbeitsgruppe Edinger/Hoffmann für die kollegiale, freundliche Zusammenarbeit und Unterstützung. Besonders Dank schulde ich Lucia Schwarzfischer und Dr. rer. nat. Chrisitan Schmidl für die Anfertigung der Microarrays und die Probenanalysen am Bioanalyzer.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und insbesondere meinem Mann Andreas Höfer bedanken, die mir stets zur Seite stehen und mich auch während der Anfertigung dieser Arbeit uneingeschränkt unterstützten.

9 Lebenslauf

Beruflicher Werdegang

seit 01.07.2014	Marienhospital Stuttgart, Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, spezielle Schmerztherapie
01.04.2013- 30.06.2014	Universitätsklinikum Regensburg, Klinik für Anästhesiologie

Veröffentlichungen

Hansmann L, Schmidl C, Kett J, Steger L, Andreesen R, Hoffmann P, Rehli M, Edinger M.
Dominant Th2 Differentiation of Human Regulatory T Cells upon Loss of FOXP3-Expression, Immunology 2012 Feb 1, 188(3):1275-82

Ausbildung

2006 -2012	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
22.11.2012	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08.09.2008	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
26.09.-18.12.2011	UTH Zambia, Dr. Goma, Klinik für Innere Medizin und Notaufnahme
03/2011	Bangkok Trat Hospital, Dr. Nopphadon, Abteilung für Radiologie
1997-2006	Hardenberg-Gymnasium Fürth (math.-naturwiss. Zweig), Allgemeine Hochschulreife Facharbeit: Chancen und Risiken der Chemotherapie